

**AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE  
PROF. DR. G. SCHMALZ  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**Photodynamische Inaktivierung von *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* und  
*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* unter Verwendung von Photosan®**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin**

**der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Hans- Jürgen Nerl  
aus Lam i. d. OPf.**

**2010**

**Dekan:**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Schmalz**

**2. Berichterstatter: PD Dr. Tim Maisch**

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2011



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
2.1. Einführung von Antibiotika und deren Grenzen.....	3
2.2. Chlorhexidin als Desinfektionsmittel .....	5
2.3. Definition und Geschichte der Photodynamischen Therapie (PDT) .....	6
2.4. Reaktionsmechanismus der PIB (Photodynamische Inaktivierung von Bakterien).....	6
2.5. Photosensibilisatoren und deren Akkumulation in Bakterien.....	9
2.6. <i>Streptococcus mutans</i> ( <i>S. mutans</i> ) als Leitkeim in der Kariologie .....	11
2.7. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ( <i>A. ac</i> ) als Leitkeim in der Parodontologie.....	11
<b>3. Fragestellung .....</b>	<b>13</b>
<b>4. Material .....</b>	<b>14</b>
4.1. Biologisches Material .....	14
4.1.1 Bakterienstämme .....	14
4. 2. Photosensibilisator (PS).....	14
4.2.1. Photosan® .....	14
4.3. Reagenzien und Puffer.....	16
4.4. Bakterienkulturmedien.....	16
4.4.1. <i>Streptococcus mutans</i> .....	16
4.4.2. <i>Escherichia coli</i> .....	16
4.4.3. <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> .....	17
4.5. Technische Geräte.....	17
4.5.1. Lichtquelle .....	17
4.5.2. Zentrifugen .....	18
4.5.3. Spectralphotometer.....	18
4.5.4. Küvette.....	18
4.5.5. Hilfsmittel zur Kultivierung von <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> . .....	18
4.5.6. Fluoreszenzmikroskop.....	18
<b>5. Methoden .....</b>	<b>19</b>
5.1. Bakterienkulturverfahren.....	19
5.1.1. <i>Streptococcus mutans</i> .....	19
5.1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	19
5.1.3. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .....	19

5.2. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten .....	20
5.3. Bestimmung der Phototoxizität .....	20
5.3.1. Phototoxizitätstest mit <i>S. mutans</i> .....	20
5.3.2. Phototoxizitätstest mit <i>E. coli</i> .....	21
5.3.3. Phototoxizitätstest mit <i>A. ac</i> .....	21
5.4. Experimente zur Bestimmung der Aufnahme des Photosensibilisators in Bakterien .....	23
5.4.1. Spektroskopie .....	23
5.4.2. Fluoreszenzmikroskopie .....	23
5.5. Datenverarbeitung und statistische Analyse der KBE/ml .....	23
<b>6. Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
6.1. Nachweis der Aufnahme von Photosensibilisatoren durch Bakterien .....	25
6.1.1. Inkubation von Bakterien mit Photosan® .....	25
6.1.2. Zelluläre Aufnahme von Photosan® .....	27
6.2. Bestimmung der Phototoxizität von Photosan® bei Gram(+) und Gram(-) Bakterien am Beispiel von <i>S. mutans</i> und <i>E. coli</i> .....	28
6.2.1. Vergleich von <i>S. mutans</i> und <i>E. coli</i> bei 5 min Inkubation .....	29
6.2.2. Vergleich von <i>S. mutans</i> und <i>E. coli</i> bei 15 min Inkubation .....	31
6.2.3. Vergleich von <i>S. mutans</i> und <i>E. coli</i> bei 90 min Inkubation .....	32
6.2.4. Bestimmung der Phototoxizität von Photosan® bei <i>A. ac</i> .....	34
<b>7. Diskussion .....</b>	<b>36</b>
7.1. Phototoxizität von Photosan® .....	37
7.1.1. Phototoxizität bei Gram(+) Bakterien .....	37
7.1.2. Phototoxizität bei Gram(-) Bakterien .....	39
7.1.3. Phototoxizität bei <i>A. ac</i> .....	40
<b>8. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>42</b>
<b>9. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>43</b>
<b>10. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>51</b>
<b>11. Abbildungen .....</b>	<b>53</b>
<b>12. Lebenslauf .....</b>	<b>74</b>
<b>13. Danksagung .....</b>	<b>75</b>

## 1. Einleitung

Bakterien sind in der Mundhöhle häufig die Ursache von Erkrankungen (76). Die Krankheitsbilder erstrecken sich im Zahn-, Mund- und Kieferbereich von kariösen Läsionen über Erkrankungen des Parodonts bis hin zu bakteriellen Infektionen der Weichgewebe im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich, die nicht selten miteinander in Verbindung stehen und einander bedingen. Im Praxisalltag stellt die Bekämpfung dieser bakteriell verursachten Erkrankungen und Beseitigung ihrer Folgen die Hauptaufgabe von Zahnärzten dar (76, 117).

Ein zentraler Aspekt der Zahnheilkunde ist die Vermeidung von Residualkaries bzw. des Kariesrezidivs, welche durch verbliebene Mikroorganismen oder durch insuffiziente Füllungsrän­der entstehen können (83, 106). Um möglichst langlebige Restaurationen herstellen zu können, ist unter anderem eine möglichst bakterienfreie Kavität eine unabdingbare Grundvoraussetzung (20, 95).

Die am häufigsten genutzte Methode, eine saubere und keimfreie Kavität zu erhalten, stellt immer noch die Exkavierung erkrankter Zahnhartsubstanz und die anschließende Desinfektion der dargestellten Dentin- und Schmelzoberflächen dar. Dabei ergibt sich in der täglichen Praxis das Problem der Überpräparation, wenn mit zahnärztlichen Instrumenten zu viel Zahns­ubstanz, also gesundes Gewebe, abgetragen wird (54, 58). In tiefen Läsionen kommt es dadurch oft zu Irritationen der Zahnpulpa und gelegentlich sogar zu deren Eröffnung, was wiederum weitere Behandlungsmaßnahmen nach sich zieht (4, 52). Um dem entgegenzuwirken wird versucht, durch neue Präparationsverfahren, die auf Ultraschallabrasion oder der Wirkung von Laserlicht basieren, selektiv erkranktes Gewebe zu entfernen (44, 53, 54, 101). Diese Verfahren gehen oft für den Behandler wie auch für den Patienten mit einem erhöhten zeitlichen, materiellen und finanziellen Aufwand einher. Bei der Therapie von parodontalen Erkrankungen ist ebenfalls das Verbleiben von Mikroorganismen in Zahnfleischtaschen und umliegenden Weichgeweben die Ursache für rezidivierende Parodontopathien (73). Daher ist für eine erfolgreiche Behandlung eine weitgehende Reduktion pathogener Mikroorganismen in der Zahnfleischtasche anzustreben. Bewährt hat sich hier die mechanische Entfernung der subgingivalen Konkreme­nte mithilfe von Ultraschallgeräten, oder die Verwendung von Küretten und Scalern mit anschließender Desinfektion durch Spülen

mit Substanzen wie etwa Chlorhexidin (CHX), das durch seine hohe Substantivität einen länger anhaltenden desinfizierenden Effekt aufweist (16, 30, 107). Ähnlich wie bei der Exkavation kariöser Zahnhartsubstanz geht auch die Entfernung von subgingivalen Konkrementen mit dem Verlust von nicht erkranktem Wurzelzement bzw. Wurzelentin einher, was zu einer Schwächung und evtl. Traumatisierung des Zahnes führen kann. Bei besonders schweren Fällen parodontaler Entzündungen werden zusätzlich Antibiotika systemisch verabreicht, um das vorherrschende pathologische in ein physiologisches Keimpektrum zu überführen bzw. um die Anzahl der Bakterien zu reduzieren. Das Auftreten von Medikamentenunverträglichkeit und Nebenwirkungen beim Patienten sowie die Entwicklung von Resistenzgenen in den Bakterien sind bei der Antibiosetherapie als nachteilig anzusehen (79, 82, 87-90).

Die heute üblichen Behandlungsmethoden zur Bakterienreduktion in Parodontologie und Kariologie sind sehr effizient und können nach wie vor als Goldstandard betrachtet werden. Um jedoch die Behandlung und Prophylaxe von bakteriellen Infektionen in der Mundhöhle weiter zu optimieren und die erwünschte Bakterienreduktion noch weiter vorantreiben zu können und um gleichzeitig die negativen Folgen der heute gebräuchlichen Verfahren zu minimieren, wird in dieser Arbeit unter Verwendung des als Medizinprodukt zugelassenen Photosensibilisators Photosan<sup>®</sup>, der Effekt der Photodynamischen Inaktivierung gegen die in der Zahnmedizin als Leitkeime angesehenen Bakterien *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) und *Aggratibacter actinomycetemcomitans* (*A. ac*) und dem klassischen Vertreter der Gram(-) Bakterien *Escherichia coli* (*E. coli*) untersucht.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Einführung von Antibiotika und deren Grenzen

Durch die Entdeckung von Sulfonamiden und Penicillinen gerieten die Erkenntnisse über die Photooxidative Inaktivierung von Bakterien in Vergessenheit, bzw. wurden nicht mit der gleichen Konsequenz weitergeführt wie es bei Antibiotika der Fall war. Die Problematik der Antibiotikabehandlung bei bakteriellen Erkrankungen zeigte sich bereits 1950, als festgestellt werden musste, dass bereits 50% aller *S. aureus* Stämme resistent gegenüber Penicillin waren (41, 42). Bereits ein Jahr nach der Einführung von Methicillin ließen sich ebenfalls schon *S. aureus* isolieren, die gegen dieses neue Antibiotikum resistent waren (45). Mit dem Auftreten von multiresistenten Bakterien erschwerte sich die antibakterielle Behandlung in zunehmendem Maß, so dass die Notwendigkeit zur Entwicklung von alternativen Verfahren zur Inaktivierung von Gram(+) sowie Gram(-) Bakterien gegeben war (59, 60, 97). Auch bei Erkrankungen in der Mundhöhle spielen oft Bakterien eine führende Rolle. Zu nennen sind hier vor allem die degenerativen Erkrankungen des Zahnhalteapparates, wie die bakteriell induzierte Parodontitis oder die Entstehung von Karies, deren multifaktorielle Genese immer mit der Akkumulation von Keimen einhergeht (6). Der gegenwärtig angewendete Therapieansatz bei durch Plaque induzierten Erkrankungen ist die mechanische Entfernung der pathogenen Keime und Organismen. Pathogene Biofilme werden durch die Exkavation von infiziertem Schmelz und Dentin mit Bohrern und Handinstrumenten oder durch die supra- bzw. subgingivale Kürettage von Zähnen und Zahnfleischtaschen bei Parodontitis zerstört.

In der Kariestherapie stehen dem Zahnarzt eine Vielzahl an Instrumenten zur Verfügung, mit denen zerstörte und infizierte Zahnhartsubstanz abgetragen werden kann. Allen voran ist hier der Einsatz von rotierenden Schleifkörpern zu nennen. Eine wachsende Anzahl von Zahnmedizinern nutzt auch ultraschallbetriebene Systeme und seit neuerem sind auch Lasersysteme auf dem Markt, deren Selektivität benutzt werden kann, um erkrankte Zahnhartsubstanz zu entfernen (43). In der Parodontologie werden anhand scharfer Klingen Konkrement unterhalb der



Gingiva entfernt. Unterstützend werden hier oft ultraschallbetriebene Geräte, oder Pulverstrahlssysteme eingesetzt.

Unterstützend werden antimikrobielle Substanzen wie Antibiotika oder Desinfektiva genutzt, um den Erfolg der Behandlung zu optimieren (118). Da die in der Mundhöhle lokalisierten Bakterien ebenfalls Resistenzgene entwickeln können, kann davon ausgegangen werden, dass antibiotisch unterstützte Therapieansätze in einzelnen Fällen an Effektivität verlieren werden. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass in der oralen Microflora Tetracyclin-Resistenz-Gene vorhanden sind (26, 92, 98, 114).

Bei einer Vergleichsstudie pathogener Parodontalkeime von niederländischen und spanischen Parodontitispatienten wurden *A. ac*-Stämme isoliert, die resistent gegen Penicillin G, Clindamycin und Metronidazol waren (112). Es wurde auch gezeigt, dass amoxicillinresistente Bakterienstämme in der Mundhöhle vorhanden sind, und dass durch Anwendung von Amoxicillin wiederum Resistenzen gegen Erythromycin provoziert werden können (85). Bei der refraktären Parodontitis ist der Behandler mit einer schwer zu beherrschenden Form des Krankheitsbildes der Parodontitis konfrontiert. Die diffizile Kontrolle der subgingivalen Plaque und die erschwerte mechanische Reinigung von tiefen parodontalen Taschen können hierfür als Gründe genannt werden. Ein weiterer Grund, der für das Auftreten von refraktären Parodontitiden verantwortlich gemacht werden kann, ist die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen der parodontalen Microflora. Es ist erwiesen, dass eine wesentliche Anzahl von Mikroorganismen, die mit refraktärer Parodontitis in Verbindung gebracht werden können, resistent gegen die üblicherweise eingesetzten Antibiotika ist (34, 35). Durch die Produktion von  $\beta$ -Lactamasen gelingt es diesen Mikroorganismen der antibakteriellen Wirkung zu widerstehen. Es konnte gezeigt werden, dass die zur  $\beta$ -Lactamaseproduktion fähigen Keime in der subgingivalen Plaque seit Beginn der Anwendung von Antibiotika zunehmen. Vor allem sind hier Vertreter der *Prevotella*-Spezies zu nennen, die durch  $\beta$ -Lactamaseproduktion nicht mehr empfindlich gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika und Nitroimidazolen reagieren (56). Weitere Vertreter der Mikroorganismen, welche Resistenzgene bilden, sind vor allem Gram(-) Bakterien (27, 34, 35, 38, 61, 66).

## 2.2. Chlorhexidin als Desinfektionsmittel

Neben Antibiotika werden auch Desinfektionsmittel und Antiseptika eingesetzt um den Erfolg von mechanischen Therapien in Kariologie und Parodontologie zu optimieren (63, 71, 116). In diesem Zusammenhang ist hauptsächlich Chlorhexidin zu nennen. Die Vorteile dieses Desinfektionsmittels liegen in der hohen Substantivität und dem guten Effekt gegenüber Gram(+) und Gram(-) Bakterien (23). Außerdem wurde bisher noch kein Fall beschrieben, in der eine Resistenz gegenüber Chlorhexidin bewiesen worden wäre (99). Allerdings treten bei regelmäßigem Gebrauch dunkle Verfärbungen an Zähnen und Mundschleimhaut auf. Es werden in der Literatur aber auch wesentlich bedrohlichere Folgen beschrieben, die auf die Applikation von Chlorhexidin zurückzuführen sind (1, 74). So besteht die Möglichkeit, dass Patienten nach Anwendung des Desinfektionsmittels anaphylaktische Reaktionen zeigen (31, 50, 62). Diese sind allerdings sehr selten und treten gehäuft bei Patienten auf, die auch vorher schon Kontaktdermatitiden und Sensibilitäten nach Anwendung von Chlorhexidin zeigten. Trotz der Seltenheit dieser Vorfälle wurde z.B. 1983 vom japanischen Gesundheitsministerium empfohlen, die Anwendung von Chlorhexidin zu vermeiden (55), wobei sich diese Empfehlung jedoch nicht durchgesetzt hat. Die bereits etablierten Methoden zur Therapie von Parodontitis, also Kürettage, Antibiose und Desinfektion, weisen gute Erfolge auf. Daher könnte die Photodynamische Inaktivierung von Bakterien (PIB) könnte allerdings zukünftig unterstützend zum Heilungserfolg bei komplizierten Fällen und zum Vermeiden von evtl. Nebenwirkungen beitragen (12, 104).

### 2.3. Definition und Geschichte der Photodynamischen Therapie (PDT)

Bei der photodynamischen Reaktion werden durch einen Photosensibilisator, der durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregt wird, in Anwesenheit von Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erzeugt. Diese ROS bilden die Grundlage der antibakteriellen Wirkung.

Geschichtlich betrachtet wurde der Begriff der Photodynamischen Therapie schon im Jahre 1900 geprägt. Oskar Raab erkannte bereits zu diesem Zeitpunkt die Interaktion von Acridin mit sichtbarem Licht. Unter aeroben Bedingungen konnte er einen zytotoxischen Effekt bei *Paramezien* erkennen. Von Tappeiner, der Doktorvater von Oskar Raab, zeigte dann, dass die Toxizität auf der Bestrahlung durch Licht und nicht auf Wärmeentwicklung beruhte und prägte damit den Begriff der „Photodynamik“ (67, 120).

Ohne den genauen Wirkmechanismus zu kennen, führten H. v. Tappeiner und A. Jesionek erste Versuche am Menschen durch. Bei diesen Experimenten wurde die phototoxische Reaktion durch Auftragung von Eosin auf die Haut und anschließender Bestrahlung mit Licht in der Behandlung von Krebs, Tuberkulose und Syphilis auf der Haut untersucht (105, 120). Dies waren die ersten onkologischen Anwendungen der Photodynamischen Therapie. Um 1905 wurden auch schon Experimente mit pathogenen Bakterien durchgeführt. Huber konnte zeigen, dass *Streptococcus pyogenes* nach Inkubation mit Eosin und anschließender Bestrahlung mit sichtbarem Licht abgetötet werden kann. Alleine die Bestrahlung mit Licht führte zu keiner Abtötung der Bakterien (40).

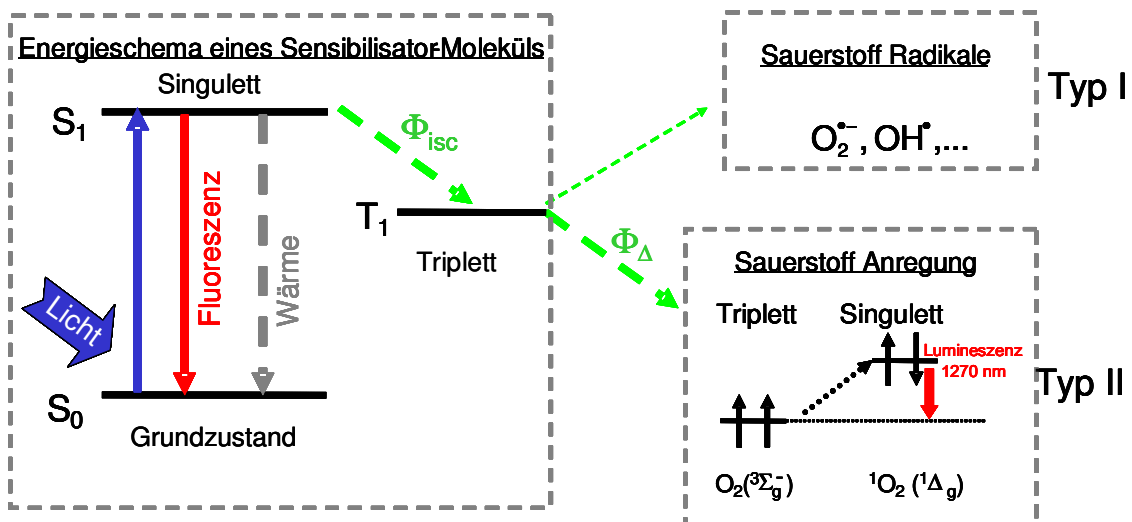
### 2.4. Reaktionsmechanismus der PIB (Photodynamische Inaktivierung von Bakterien)

Das Prinzip der Photodynamischen Inaktivierung von Bakterien (PIB) beruht auf dem Ablauf von zwei unterschiedlichen photooxidativen Prozessen. Man unterscheidet hier zwischen der Typ-I- und der Typ-II-Reaktion. Grundlage dieser Prozesse ist ein ausreichendes Sauerstoffangebot und ein in bzw. auf den Bakterien lokalisierter Photosensibilisator, der durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregt

wird. Photosensibilisatoren sind chemische Verbindungen, welche durch Einwirkung von Licht ihre physikalischen Eigenschaften ändern können.

Bei der Typ-I-Reaktion werden Elektronen vom angeregten Photosensibilisator auf ein Substrat in seiner Umgebung übertragen. Hierbei wird der Photosensibilisator aus seinem Grundzustand in den angeregten Singulettzustand und anschließend in die langlebigere Form des Triplettzustands überführt. Bedingt durch diese Reaktion entstehen Radikale wie Superoxidanionen, Peroxidradikale und Hydroxylradikale, die ihrerseits mit Sauerstoff reagieren und Oxidationsprodukte bilden. Dabei bestimmt das relative Redoxpotential zwischen Substrat und Photosensibilisator die Richtung des Elektronentransfers (5, 115). Konkurrierend dazu findet die Typ-II-Reaktion statt. Hier liegt der Photosensibilisator ebenfalls im Triplettzustand vor und die Energie wird direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen. Dadurch entsteht der hochreaktive Singulett-Sauerstoff, der wiederum mit bestimmten Zielstrukturen in seiner unmittelbaren Nähe reagiert und damit die sogenannte Photooxidation in Gang bringt (Abb. 1).

**Abb. 1**



**Abb. 1: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies**

Durch die Bestrahlung mit Licht wird der Photosensibilisator aus seinem Grundzustand  $S_0$  in den angeregten Singulettzustand  $S_1$  überführt. Ein strahlungsloser Übergang führt zum langlebigeren Triplettzustand  $T_1$ . Bei der Typ-I-Reaktion werden Elektronen vom angeregten Photosensibilisator  $T_1$  direkt auf ein Substrat, also auf das umliegende Gewebe, übertragen. Es entstehen Radikale und deren Reaktionsprodukte mit Sauerstoff. Der Energieübertrag während der Typ-II-Reaktion erfolgt direkt vom Triplettzustand des Photosensibilisators auf molekularen Sauerstoff, wodurch der hochreaktive Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) entsteht.

Vorrangig findet die Photooxidation von Biomolekülen statt, die sich in direkter Nachbarschaft zu den reaktiven Sauerstoffspezies befinden. Zu nennen sind hier Lipide und Proteine, deren Oxidation schließlich zum Zelltod führt (33, 46, 103). Es wird derzeit angenommen, dass bei exogenen Photosensibilisatoren vor allem die Typ-II-Reaktion und damit Singulett-Sauerstoff für die stattfindenden Effekte verantwortlich ist. Bedingt durch die starke Reaktivität des Singulett-Sauerstoffes ist dessen Halbwertszeit mit ca. 3,5  $\mu$ s in Wasser nur sehr kurz, resultierend in einem ebenfalls sehr kurzen Diffusionsweg (bis 20 nm) in die Zelle. Daraus ergibt sich die Abhängigkeit der Art des oxidativen Schadens von der zellulären Lokalisation des Photosensibilisators (78). Da viele der verwendeten Photosensibilisatoren lipophilen Charakters sind, akkumulieren sie bevorzugt im Bereich von Membranen aus Lipid-Doppelschichten. Aus diesem Grund entstehen die zum Zelltod führenden Veränderungen an den Fettsäuren und Proteinen im Bereich der Plasmamembran. Oxidationsprodukte, wie zum Beispiel Lipidhydroperoxide, denaturierte Proteine und neue Proteinvernetzungen, die durch die photodynamischen Reaktionen entstehen, können gleichermaßen die Zelle schädigen, bzw. einen Funktionsfehler induzieren (115).

## 2.5. Photosensibilisatoren und deren Akkumulation in Bakterien

Derzeit stehen verschiedene Stoffklassen, die photodynamische Aktivität zeigen, zur Verfügung, die gegenüber Gram(+) und Gram(-) Bakterien jeweils unterschiedliche Wirkung zeigen (9, 18, 70, 118, 119). In diesem Zusammenhang sind synthetische nicht-Porphyrinderivate aus der Gruppe der Phenothiazine, Methylene-Blau und Toluidin-Blau zu nennen. Daneben finden sich makrozyklische Moleküle (Phtalocyanine, Porphyrine) und in der Natur vorkommende Photosensibilisatoren (Psoralene, Perylenquinoide), die eine photodynamische Aktivität aufweisen (75). Aktuell werden in der Photodynamischen Therapie oft Photosan<sup>®</sup> und 5-Ala als Photosensibilisatoren verwendet. Das Molekül von Photosan<sup>®</sup> ist aus mehreren Porphyrinringen aufgebaut, wurde bereits 1995 für die klinische PDT zugelassen und wird bei verschiedenen onkologischen Indikationen eingesetzt (19).

Während Gram(+) Bakterien eine 20-80 nm dicke Zellwand besitzen, deren Hauptbestandteil aus Peptidoglykanen besteht, ist die Zellwand der Gram(-) Bakterien nur bis zu 10 nm dick und von einer ungefähr 3 nm starken Schicht mit einer trilamellären Struktur aus Lipopolysacchariden umgeben. Durch diese beiden Membranen wird der periplasmatische Raum beschrieben. Aufgrund der Unterschiede in der Zellwandstruktur von Bakterien unterscheidet sich auch die phototoxische Wirkung der Photosensibilisatoren gegenüber den verschiedenen Bakterienstämmen (Abb. 2 A und B).

Neutrale Photosensibilisatoren oder solche mit negativer Ladung binden gut an Membranen von Gram(+) Bakterien und führen hier nach durchgeführter Photodynamischer Therapie zu einer Einschränkung der Wachstumsrate oder zum Tod der Bakterien (68). Bei Gram(-) Bakterien hingegen binden anionische bzw. neutrale Photosensibilisatoren nur an der äußeren Membran der bakteriellen Zellwand und haben keinen Einfluss auf das Überleben der Mikroorganismen. Werden zusätzlich Detergentien verwendet, die die Integrität der Zellwand von Gram(-) Bakterien lösen, wie zum Beispiel EDTA, so kann beobachtet werden, dass sich *E. coli* erfolgreich mit Photodynamischer Therapie abtöten lässt (69, 108-110). Werden Gram(-) Bakterien aber mit positiv geladenen Photosensibilisatoren wie zum Beispiel Phenothiazinen, Porphyrinen oder Phtalocyaninen inkubiert, können sie

erfolgreich durch photooxidative Reaktionen inaktiviert werden (77, 86, 115), ohne dass Zusätze wie EDTA zur Anwendung kommen.

Abb. 2

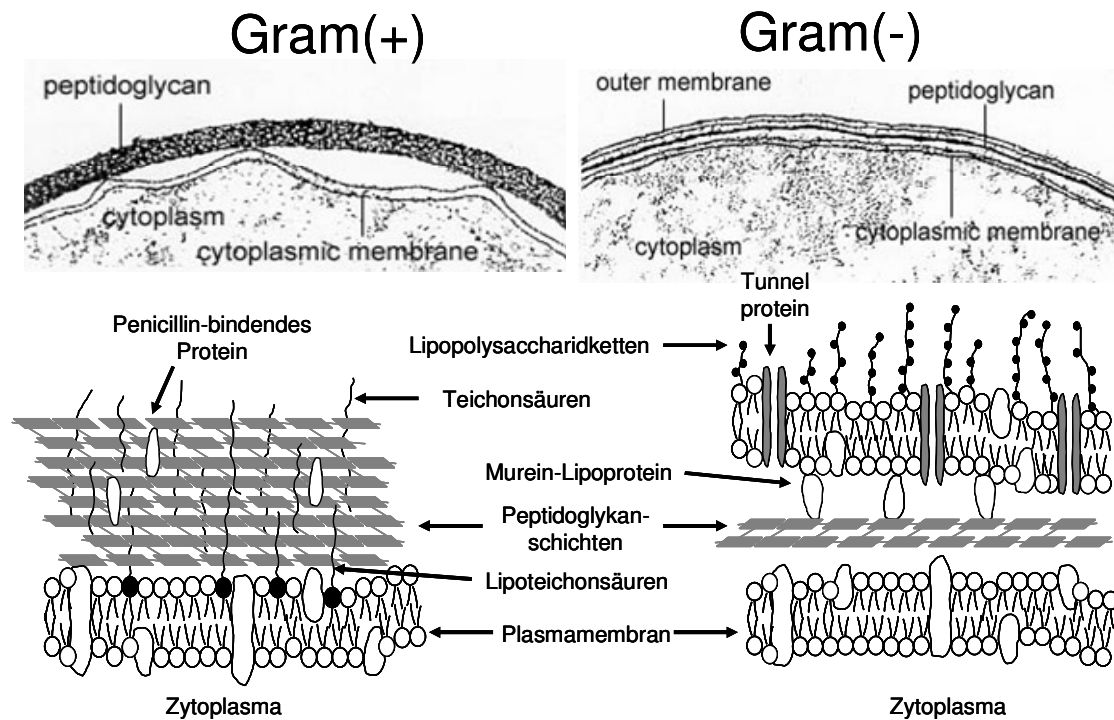


Abb. 2: Schematischer Aufbau der bakteriellen Zellwand

Im oberen Abschnitt: elektronenmikroskopische Aufnahmen der bakteriellen Zellwand (48).

**Links:** Gram(+) Bakterien besitzen eine etwa 15-80 nm dicke Zellwand, bestehend aus bis zu 100 Schichten von Peptidoglykanen, in welche Teichonsäuren, mit und ohne Lipidanteil, vernetzt sind. Proteine, z.B. Penicillin-bindende Proteine sind mit in die Peptidoglykanschichten eingebettet.

**Rechts:** Gram(-) Bakterien besitzen eine dünne, innere Zellwand bestehend aus 2-3 Schichten von Peptidoglykanen (2-3 nm), einen periplasmatischen Raum und eine äußere bilaminäre Lipidmembran (7 nm). Die äußere Doppelmembran besteht auf der Innenseite aus Phospholipiden, die über Lipoproteine mit der angrenzenden Mureinschicht verbunden sind. Die Außenseite besteht aus Lipopolysacchariden (LPS) und Porinen (Tunnelproteine).

## 2.6. *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) als Leitkeim in der Kariologie

Karies ist multifaktoriell bedingt. Der komplexe Entstehungsprozess dieser Erkrankung wird durch das Zusammenspiel mehrerer Faktoren verursacht. Zu den drei primären Faktoren gehören der Zahn als krankheitsanfälliges Gewebe, der bakterielle Zahnbelag und die Bereitstellung von kariogenem Substrat (niedermolekulare Kohlenhydrate). Die Flussrate des Speichels und dessen Zusammensetzung, die Dauer und Häufigkeit der Substratzufuhr, Zahnfehlstellungen und sozioökonomische Bedingungen gelten als sekundäre Faktoren in der Entstehung und Progression von kariösen Läsionen (24, 25, 113). Zahnkaries entsteht in Folge einer Säureproduktion durch acidophile Bakterienarten, wie z.B. *Lactobacillen* und *Actinomyceten*. Auch *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus salivarius* und *Streptococcus mutans* spielen eine wichtige Rolle in einer kariogenen Mundflora (7, 17, 22, 65, 111). Unter den säureproduzierenden Mikroorganismen nimmt der Gram(+) *S. mutans* eine zentrale Rolle ein (14, 111). Nachdem sich oben genannte Bakterien in supragingivalen Bereichen der Zähne akkumuliert haben, metabolisieren sie Kohlenhydrate zu sauren Endprodukten, welche in der Lage sind, Zahnhartsubstanz zu demineralisieren, was schließlich zu einer kariösen Läsion führen kann. Danach infiltrieren die Bakterien aus dem pathogenen akkumulierten Biofilm das an den Schmelz angrenzende Dentin und der Defekt wird größer und tiefer (49, 94).

## 2.7. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. ac*) als Leitkeim in der Parodontologie

*A. ac* gehört zu den Gram(-), nicht beweglichen und fakultativ anaeroben Kokken (39). Gefunden wird *A. ac* in der Mundhöhle des Menschen. Ein klar definierter oraler Aufenthaltsort konnte bisher nicht entdeckt werden. Es wird vermutet, dass er hauptsächlich in der Region des Gingivalsaumes vorkommt. Beim unbezahnten Kiefer kommen keine Vertreter von *A. ac* vor (29, 51).

Als Parodontitis wird die Entzündung des Zahnhalteapparates definiert. Verursacht wird diese Erkrankung durch Bakterien und die Entzündungsreaktionen des Körpers (57). Parodontale Erkrankungen, die von einem bakteriellen Belag an und



unter der marginalen Gingiva herrühren, sind durch ein Ablösen des Halteapparates von der Wurzeloberfläche mit konsekutivem Knochenverlust charakterisiert. Dieser sogenannte Attachmentverlust resultiert in parodontalen Taschen. Letztendlich wird Alveolarknochen abgebaut, was in letzter Konsequenz den Verlust des Zahns bedingen kann (13, 21, 118). Unter den Erwachsenen im Alter zwischen 45-54 Jahren sind 14% und im Alter zwischen 65-74 Jahren 23% an einer lokalisierten aggressiven Parodontitis erkrankt (36, 37). Die mit parodontalen Erkrankungen assoziierten Mikroorganismen sind hauptsächlich Gram(-) obligat anaerobe Bakterien, wie *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsythus* (64, 102). Einer der wichtigen Leitkeime in der Parodontologie ist das Bakterium *A. ac* (119).

### 3. Fragestellung

Inspiziert von der erfolgreichen Anwendung der Photodynamischen Therapie bei pathogenen Keimen in der Dermatologie, soll in vorliegender Arbeit die Effektivität der antibakteriellen Photodynamischen Therapie gegenüber relevanten Leitkeimen in der Zahnheilkunde, wie *S. mutans* oder *A. ac*, untersucht werden.

Als Photosensibilisator wurde der Farbstoff Photosan<sup>®</sup> verwendet. Photosan<sup>®</sup> ist für verschiedene klinische Anwendungen als Medizinprodukt von der Europäischen Union seit 2002 zugelassen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Inaktivierungseffizienz von Photosan<sup>®</sup> gegenüber den relevanten Zahnkeimen *S. mutans* als Vertreter für ein Gram(+) Bakterium und *A. ac* als Vertreter für ein Gram(-) Bakterium untersucht werden. Als Gram(-) Referenzkeim wurde das ubiquitär vorkommende Bakterium *E. coli* verwendet. Neben der Konzentration des Photosensibilisators wurde nach Bestrahlung der Zusammenhang von unterschiedlichen Inkubationszeiten des Farbstoffes und wechselnden Bestrahlungsintensitäten auf Phototoxizität hin untersucht. Neben diesem Schwerpunkt wurde versucht, ein geeignetes Verfahren zu etablieren um *A. ac* so zu kultivieren, dass Phototoxizitätsversuche durchgeführt werden können.

## 4. Material

### 4.1. Biologisches Material

#### 4.1.1. Bakterienstämme

*Streptococcus mutans* Clarke 1924<sup>AL</sup> (Bacteria) von DSMZ, der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig-Strain DSM 20523 (entspricht der ATCC31988); *Streptococcus mutans* ist ein Gram(+) Bakterium und gehört zur Gattung der Streptokokken und ist Leitkeim bei der Entstehung von Karies.

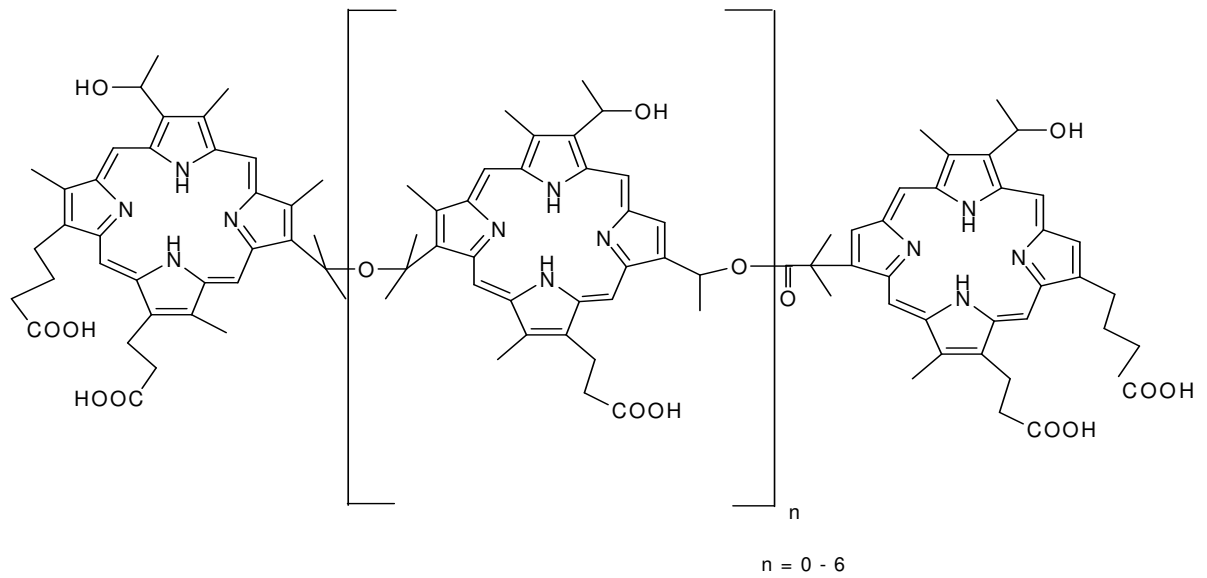
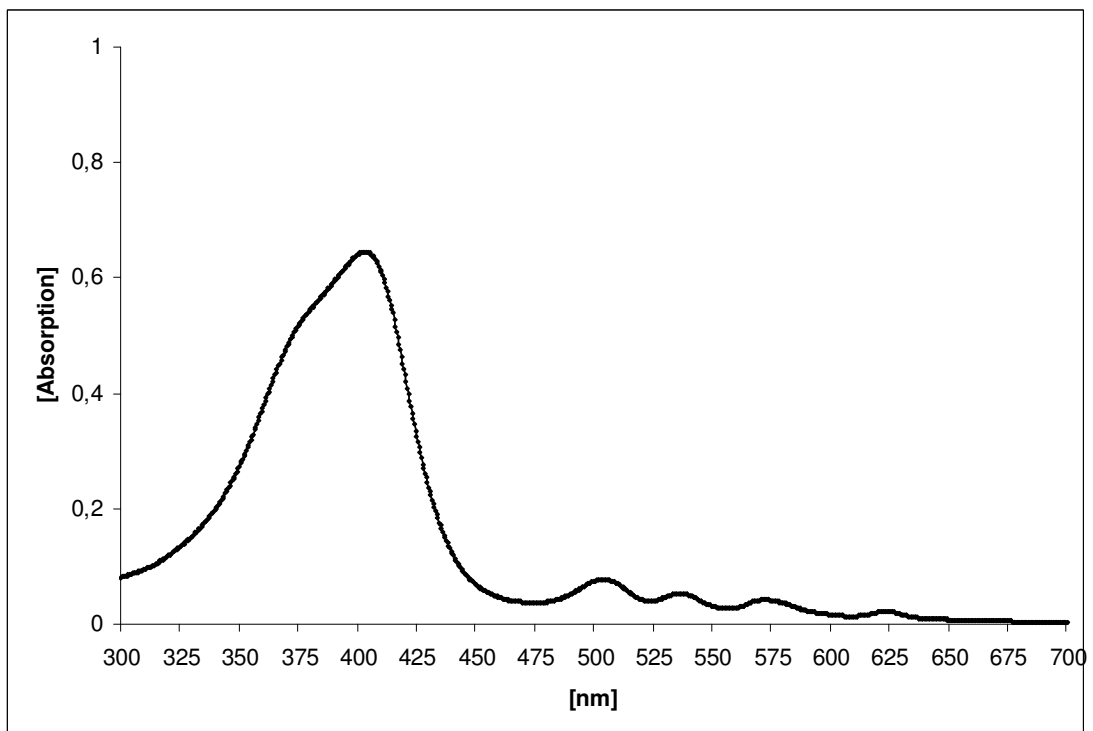
*Escherichia coli* ATCC 25922 ist in der Mikrobiologie der klassische Vertreter Gram(-) Bakterien.

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 ist ein Gram(-) Bakterium und Leitkeim in der Parodontologie.

### 4. 2. Photosensibilisator (PS)

#### 4.2.1. Photosan<sup>®</sup>

Photosan<sup>®</sup> (Sinclair Pharmaceuticals Ltd., Godalming, UK) ist ein von der Europäischen Union seit August 2002 für die klinische PDT bei verschiedenen Indikationen zugelassenes Medizinprodukt. Das Oligomeregemisch besteht aus bis zu acht Porphyrinringen, die über Ester- und Etherbindungen miteinander verbunden sind (Abb. 3). Es handelt sich um ein sehr großes Molekül mit einem Molekulargewicht von ca. 1135 g/mol, dessen Absorptionsmaxima bei ca. 400 nm (Soret-bande) und im Bereich von 500-620 nm (Q-Banden) liegen (Abb. 4)

**Abb. 3****Abb.3 Strukturformel von Photosan® mit ISIS Draw2.0 gezeichnet****Abb. 4****Abb. 4: Absorptionsspektrum von Photosan® selbst gemessen und repräsentativ dargestellt**

Das Absorptionsspektrum von Photosan® hat sein Absorptionsmaximum bei 400 nm (die Soret-bande) und die charakteristischen Q-Banden bei den längeren Wellen zwischen 475 und 650 nm.

### 4.3. Reagenzien und Puffer

#### Reagenzien

Mannitol (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

NaN<sub>3</sub> (Sigma )

#### Puffer

PBS von Biochrom (Berlin, Deutschland); „phosphate buffered saline“, physiologischer Phosphatpuffer mit folgender Zusammensetzung (bezogen auf 1 Liter):  
8000 mg NaCl, 200 mg KCl, 1150 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 4.4. Bakterienkulturmedien

Zur Animpfung von Flüssigkulturen und Gewinnung von Einzelkolonien wurden für die einzelnen Bakterien verschiedene Flüssigkulturmedien und Agarplatten wie folgt verwendet:

#### 4.4.1. *Streptococcus mutans*

a) TSBY-Medium (Trypticase-Soja-Hefeextrakt, selbst hergestellt)

Inhalt: 30,0 g Trypticase-Soja-Mehl, 3,0 g Hefeextrakt, 1000,0 ml destilliertes Wasser

b) TSBY-Agar

Inhalt: wie TSBY-Medium, zusätzlich 15,0 g/l Agar-Agar

#### 4.4.2. *Escherichia coli*

a) Müller-Hinton-Bouillon (Oxoid, Wesel, Deutschland)

Inhalt: 2,0 g/l Rindfleisch, 17,5 g/l Caseinhydrolysat,  
1,5 g/l Stärke, pH: 7,4 ± 0,2

b) Müller-Hinton-Agar (Oxoid, Wesel, Deutschland)

Inhalt: wie Müller-Hinton-Bouillon, zusätzlich 13 g/l Agar-Agar

#### 4.4.3. *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*

a) Kochblutplatten (Merck, Darmstadt, Germany)

Inhalt: 10 ml Blut, 90 ml steriler Basisnährboden (Columbia Agar Basis)

b) Caso-Bouillon (Oxoid, Wesel, Deutschland)

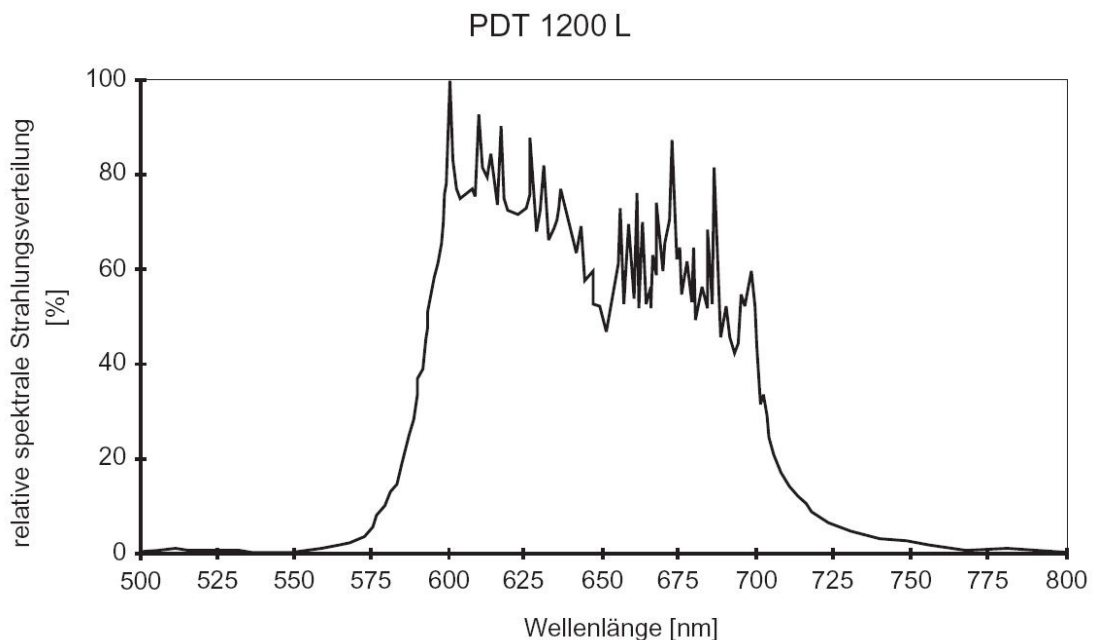
Inhalt: 17,0 g Casein Pepton, 3,0 g Sojamehl Pepton, 2,5 g D(+)-Glucose, 5,0 g NaCl, 2,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1000,0 ml destilliertes Wasser, pH: 7,3

### 4.5. Technische Geräte

#### 4.5.1. Lichtquelle

Lampe PDT1200 ( $\lambda_{em}$ : 580-740 nm) von Waldmann Medizintechnik (Villingen-Schwenningen, Deutschland). Abb. 5 zeigt das Emissionsspektrum der Lampe PDT1200L

**Abb. 5**



**Abb. 5: Emissionsspektrum der Lampe PDT1200L (von Waldmann Medizintechnik zur Verfügung gestellt). Emissionsspektrum zwischen 575nm und 700nm überlappt mit der Absorptionsbande Q IV des verwendeten Photosensibilisators Photofrin bei 625nm (vgl. Abb. 4)**

#### 4.5.2. Zentrifugen

Zentrifuge Biofuge Stratos (Haereus, Nürnberg, Deutschland)

Tischzentrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

#### 4.5.3. Spectralphotometer

Spectralphotometer DU 640 (Beckman, Fullerton, USA)

#### 4.5.4. Küvette

Küvette QS-1000 (Hellma Optik, Jena, Deutschland)

#### 4.5.5. Hilfsmittel zur Kultivierung von *Aggratibacter actinomycetemcomitans*

a) Anaerobengefäß

Anaerobengefäß (Schütt-Labortechnik GmbH, Göttingen, Deutschland)

b) Gasgeneratoren zur Herstellung von anaeroben Bedingungen

Gasgenerator GENbag anaer (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Frankreich)

c) Folien

Folienhalbschlauch (Severin, Sundern, Deutschland)

d) Schweißgerät

Folienschweißgerät (Severin, Sundern, Deutschland)

e) Indikator zum Nachweis von anaeroben Lebensbedingungen

Anaer indicator (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

#### 4.5.6. Fluoreszenzmikroskop

Fluoreszenzmikroskop Zeiss Vario-Axio Tech (Göttingen, Deutschland). Für die Anregung von Photosan<sup>®</sup> wurde der Anregungsfilter 405 DF 40, ein dichroider Spiegel 415 DRLP und ein Emissionsfilter 600 EFLP (Omega<sup>®</sup> Optical, Inc. Brattleboro, USA) benutzt.

## 5. Methoden

### 5.1. Bakterienkulturverfahren

#### 5.1.1. *Streptococcus mutans*

Eine Probe des Bakterienstammes *S. mutans* wurde aus einer Cryo-Gefrierkultur entnommen, auf TSBY-Agar-Platten vereinzelt, und unter aeroben Bedingungen bei 37°C in einer Übernachtskultur kultiviert. Daran anschließend wurden 10 ml TSBY-Flüssigmedium mit einem Abstrich der Bakterienkultur beimpft und 48 h bei 37°C bebrütet. Die so gewonnene Bakteriensuspension wurde 15 min bei 3000 Upm zentrifugiert und das erhaltene Bakterienpellet in 10 ml sterilem PBS resuspendiert. Die optische Dichte der Bakteriensuspensionen beim Phototoxizitätstest, den Versuchen zur zellulären Aufnahme des Photosensibilisators und der Fluoreszenzmikroskopie betrug 0,7 bei 650 nm, was einer Bakterienzahl von  $\sim 8 \times 10^7$ - $10^9$  Bakterien/ml entsprach.

#### 5.1.2. *Escherichia coli*

Um Bakterienkulturen von *E. coli* zu erhalten, wurde analog zum Kultivierungsverfahren für *S. mutans* vorgegangen und eine Übernachtskultur hergestellt. Als Medien wurden Müller-Hinton-Bouillon und Müller-Hinton-Agar-Platten verwendet. Die Kultivierung konnte im Gegensatz zu *S. mutans* nach 24 h beendet werden. Auch hier wurden die Übernachtskulturen zentrifugiert und die Bakterienpellets in 10 ml sterilem PBS resuspendiert. Die optische Dichte der Bakteriensuspensionen beim Phototoxizitätstest, den Versuchen zur zellulären Aufnahme des Photosensibilisators und der Fluoreszenzmikroskopie betrug 0,7 bei 650 nm, was einer Bakterienzahl von  $\sim 8 \times 10^7$ - $10^9$  Bakterien/ml entsprach.

#### 5.1.3. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Die aus einer Gefrierkultur entnommene Probe von *A. ac* wurde auf Kochblutplatten ausgestrichen und unter anaeroben Bedingungen bei 37°C 4 Tage lang kultiviert. Mit einer der so gewonnenen Einzelkolonien wurden 10 ml Caso-Bouillon angeimpft und 48 h unter anaeroben Bedingungen im Anaerobiergefäß unter An-



wendung der GENbox bei 37°C im Wärmeschrank gelagert. Die Versuche mit *A. ac* wurden ohne zu zentrifugieren mit Suspensionen in Caso-Medium durchgeführt. Auch hier wurde die optische Dichte der Bakteriensuspensionen vor Beginn des Phototoxizitätstest bestimmt. Die optische Dichte betrug 0,7 bei 650 nm, was einer Bakterienzahl von  $\sim 10^8$ - $10^9$  Bakterien/ml entsprach.

## 5.2. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Es wurden serielle Verdünnungen von  $10^{-5}$ - $10^{-9}$  der entsprechenden Bakteriensuspensionen hergestellt. 100  $\mu$ l wurden entsprechend der Bakterienarten auf Müller-Hinton- (*E.coli*), TSBY- (*S. mutans*) bzw. auf Kochblutplatten (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) aufgetragen und bei 37°C unter anaeroben (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) bzw. aeroben Bedingungen 24 bzw. 48 h (*S. mutans*) inkubiert. Danach wurden durch Auszählen der koloniebildenden Einheiten (KBE) die KBE/ml bestimmt, was als KBE-assay bezeichnet wird.

## 5.3. Bestimmung der Phototoxizität

### 5.3.1. Phototoxizitätstest mit *S. mutans*

Zu Beginn wurde eine Verdünnungsreihe mit verschiedenen Konzentrationen des Photosensibilisators hergestellt. Die verwendeten Konzentrationen waren 0  $\mu$ g/ml, 0,1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml und 500  $\mu$ g/ml. 100  $\mu$ l einer Bakteriensuspension (Bakteriendichte:  $10^8$ - $10^9$ /ml) wurden 1:1 in Eppendorfcups mit 100  $\mu$ l Photosan<sup>®</sup> 5 min, 15 min oder 90 min inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeiten wurde die Inkubation durch Abzentrifugieren gestoppt. Die Bakterien wurden 2-mal gewaschen und mit 200  $\mu$ l PBS resuspendiert. Die erhaltenen Suspensionen (je 200  $\mu$ l) wurden vollständig in 96-Well Mikrotitrierplatten übertragen und dann von oben bestrahlt. Zur Sensibilisierung der Bakterien wurde die Lampe PDT1200 von Waldmann Medizintechnik benutzt. Bestrahlt wurde jeweils 2, 10, 30 oder 60 min bei einer Leistung von 40 mW/cm<sup>2</sup> (gemessen mit einem zum Gerät gehörenden Sensor) was einer Gesamtdosis von 4,8 J/cm<sup>2</sup>, 24 J/cm<sup>2</sup>, 72 J/cm<sup>2</sup> und 144 J/cm<sup>2</sup> entsprach.

Die applizierte Gesamtdosis wurde mit der Formel  $\text{mJ/cm}^2 = \text{mW/cm}^2 * \text{Zeit (sek)}$  berechnet. Als Kontrollen wurden bestrahlte und nicht bestrahlte Bakteriensuspensionen mitgeführt, die sowohl mit als auch ohne Photosan<sup>®</sup> inkubiert wurden. Anschließend wurden die koloniebildenden Einheiten pro ml gezählt.

### 5.3.2. Phototoxizitätstest mit *E. coli*

Versuchsaufbau und Durchführung entsprechen den Beschreibungen für den Phototoxizitätstest mit *S. mutans*. Als Medien wurden allerdings Müller-Hinton-Bouillon und Müller-Hinton-Agar-Platten verwendet. Die verwendeten Konzentrationen waren 0 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml und 500 µg/ml. 100 µl einer Bakteriensuspension (Bakteriendichte:  $10^8$ - $10^9$ /ml) wurden 1:1 in Eppendorfcups mit 100 µl Photosensibilisator 5 min, 15 min und 90 min inkubiert. Bestrahlt wurde jeweils 2, 10, 30 und 60 min bei einer Leistung von 40 mW/cm<sup>2</sup>.

### 5.3.3. Phototoxizitätstest mit *A. ac*

Die Versuche mit *A. ac* wurden ohne zu zentrifugieren durchgeführt, da Vorversuche im Rahmen der vorliegenden Untersuchung gezeigt haben, dass die Bakterien durch Zentrifugieren abgetötet wurden. Es wurden ebenfalls serielle Verdünnungsreihen mit den oben genannten Farbstoffkonzentrationen hergestellt.

Die verwendeten Konzentrationen waren 0 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml und 500 µg/ml. Die verwendeten Bakterien lagen in Suspension im Medium vor. Jeweils 100 µl der Bakteriensuspension wurden mit 100 µl Farbstofflösung 5, 15 und 90 min inkubiert. Anschließend wurden die Volumina vollständig auf 96-well Mikrotitrierplatten übertragen und für 10, 30 und 60 min bestrahlt. Als Lichtquelle wurde ebenfalls die Lampe PDT1200 mit den Leistungen 24 J/cm<sup>2</sup>, 72 J/cm<sup>2</sup> oder 144 J/cm<sup>2</sup> verwendet.

Als Kontrollen wurden bestrahlte und nicht bestrahlte Bakteriensuspensionen mitgeführt, die sowohl mit als auch ohne Photosan<sup>®</sup> inkubiert wurden. Um beim KBE-assay anaerobe Bedingungen zu gewährleisten wurden die beimpften Kochblutplatten in Anaerobengefäßen bzw. in luftdicht verschweißten Folienschläuchen zusammen mit GENbox Gasgeneratoren und Anaer Indikatoren der Firma bioMérieux 48 h lang entsprechend der Herstellerangaben inkubiert. Anschlie-

ßend wurden die koloniebildenden Einheiten durch Auszählen der Platten bestimmt.

## **5.4. Experimente zur Bestimmung der Aufnahme des Photosensibilisators in Bakterien**

### **5.4.1. Spektroskopie**

Die Bakteriensuspension wurde mit 0,02 mg/ml Photosan<sup>®</sup> im Dunkeln bei 37°C während 10 min inkubiert und anschließend zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterienpellets wurden in 1 ml Triton X-100 1% resuspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Lösungen erneut bei 10000 Upm für 5 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert und danach die Absorption im Überstand mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 380 bis 800 nm gemessen. Als Blank (Hintergrundrauschen) wurde ein Ansatz mit 1 ml Bakterien ohne Photosan<sup>®</sup>-inkubation, resuspendiert in PBS, verwendet, der ebenfalls für 30 min mit 1 ml Triton X-100 1% auf Eis lysiert wurde, danach wie oben beschrieben zentrifugiert und dann der Überstand spektroskopisch untersucht.

### **5.4.2. Fluoreszenzmikroskopie**

100 µl Bakteriensuspension von *S. mutans* wurden mit 0,02 µg/ml Photosan<sup>®</sup> inkubiert (10 min) und anschließend 3-mal mit Aqua dest. gewaschen. Nach Resuspension in 100 µl PBS wurden 50 µl davon auf einen Objektträger getropft, eingedeckelt und 3 h bei 4°C gekühlt um die Beweglichkeit der Bakterien zu reduzieren. Zur Färbung der Bakterien-DNA wurden 100 µl Bakteriensuspension mit 100 µl Farbstoff Hoechst 3342, dessen Konzentration 10 µM betrug, inkubiert (10 min). Für die Aufnahmen am Spectralphotometer wurden folgende Filter benutzt: Anregungsfilter 405 DF 40, dichroider Spiegel 415 DRLP, Emissionsfilter 600 EFLP(Omega<sup>®</sup> Optical, Inc., Brattleboro, USA).

## **5.5. Datenverarbeitung und statistische Analyse der KBE/ml**

Es wurden jeweils 6 unabhängige Versuche mit den Bakterien *S. mutans*, *E. coli* und *A. ac* durchgeführt, mit jeweils einem Wert pro Versuchsbedingung bezüglich Inkubationszeit, Konzentration und applizierter Lichtdosis. Nach unabhängiger

Betrachtung wurden die jeweiligen Mediane und 25-75% Quartile berechnet und graphisch dargestellt.

Die Effektivität der Phototoxizität gegenüber Bakterien nach Bestrahlung wurde nach folgenden Richtlinien für Handhygiene im Gesundheitswesen festgelegt (11):

- Reduktion der KBE/ml um 1  $\log_{10}$ -Stufe  $\triangleq$  90% Effektivität
- Reduktion der KBE/ml um 3  $\log_{10}$ -Stufen  $\triangleq$  99,9% Effektivität
- Reduktion der KBE/ml um 5  $\log_{10}$ -Stufen  $\triangleq$  99,999% Effektivität.

Um beispielhaft zur hygienischen Händedesinfektion zugelassen zu werden, muß ein Prüfprodukt zu einer Reduktion der KBE/ml um mindestens 5  $\log_{10}$ -Stufen führen (32).

Nach den Richtlinien des NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) muss die minimale Konzentration einer Prüfsubstanz mindestens 99,9% (3  $\log_{10}$  Stufen) von lebenden Bakterien abtöten (47). Die Photodynamische Inaktivierung von Bakterien in der vorliegenden Arbeit wurde als effektiv angesehen, wenn der Wert der koloniebildenden Einheiten um mindestens 3  $\log_{10}$ -Stufen reduziert wird (Abnahme entspricht 99,9%). Zur Veranschaulichung wurde in den Graphen eine horizontale Linie eingezeichnet, die eine Abnahme um 3  $\log_{10}$ -Stufen symbolisiert. Zur statistischen Analyse wurde das Programm SPSS Version 15.0 (SPSS Incorporation, Chicago, Illinois, USA) verwendet.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Nachweis der Aufnahme von Photosensibilisatoren durch Bakterien

Für die effektive Inaktivierung von pathogenen Keimen muss ein geeigneter Photosensibilisator gefunden werden, der von den Bakterien aufgenommen werden kann. Danach erfolgt die Bestrahlung der Bakterien mit sichtbarem Licht einer bestimmten Wellenlänge. Durch die Fluoreszenzmikroskopie kann in einem ersten Schritt die Aufnahme des Photosensibilisators nachgewiesen werden.

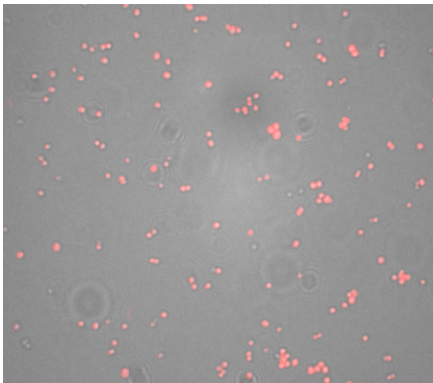
#### 6.1.1. Inkubation von Bakterien mit Photosan<sup>®</sup>

Die Bakteriensuspensionen von *S. mutans* und *E. coli* wurden mit 0,5 mg/ml Photosan<sup>®</sup> 10 min lang inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Fluoreszenzsignale konnten nur bei *S. mutans* gefunden werden (Abb. 6A). Eine weitere Probe der Bakteriensuspension von *S. mutans* wurde ohne vorhergehende Inkubation mit Photosan<sup>®</sup> unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Hier konnte wie erwartet kein Signal detektiert werden (Abb. 6B).

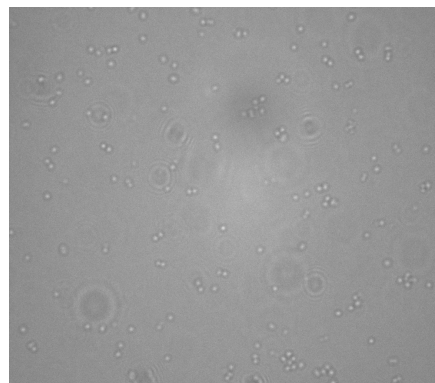
Bei *E. coli* konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen von 0,02 µg/ml Konzentration und einer Inkubationszeit von 10 min keine Fluoreszenzsignale festgestellt werden (Abb. 6C). Bei der Fluoreszenzmikroskopie von *A. ac* konnte ebenfalls kein Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

**Abb. 6**

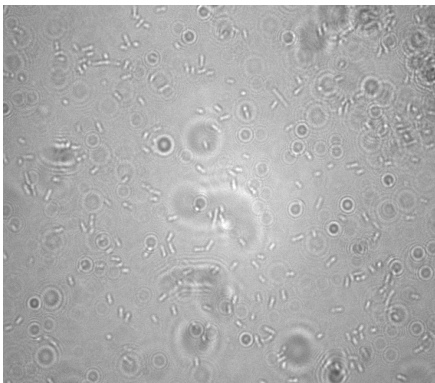
A)



B)



C)

**Abb. 6: Nachweis von Photosan® bei *S. mutans* und *E. coli***

- A) Fluoreszenzsignale bei *S. mutans* nach Inkubation mit Photosan®  
B) kein Fluoreszenzsignal bei *S. mutans* ohne Inkubation mit Photosan®  
C) kein Fluoreszenzsignal bei *E. coli* nach Inkubation mit Photosan®

### 6.1.2. Zelluläre Aufnahme von Photosan®

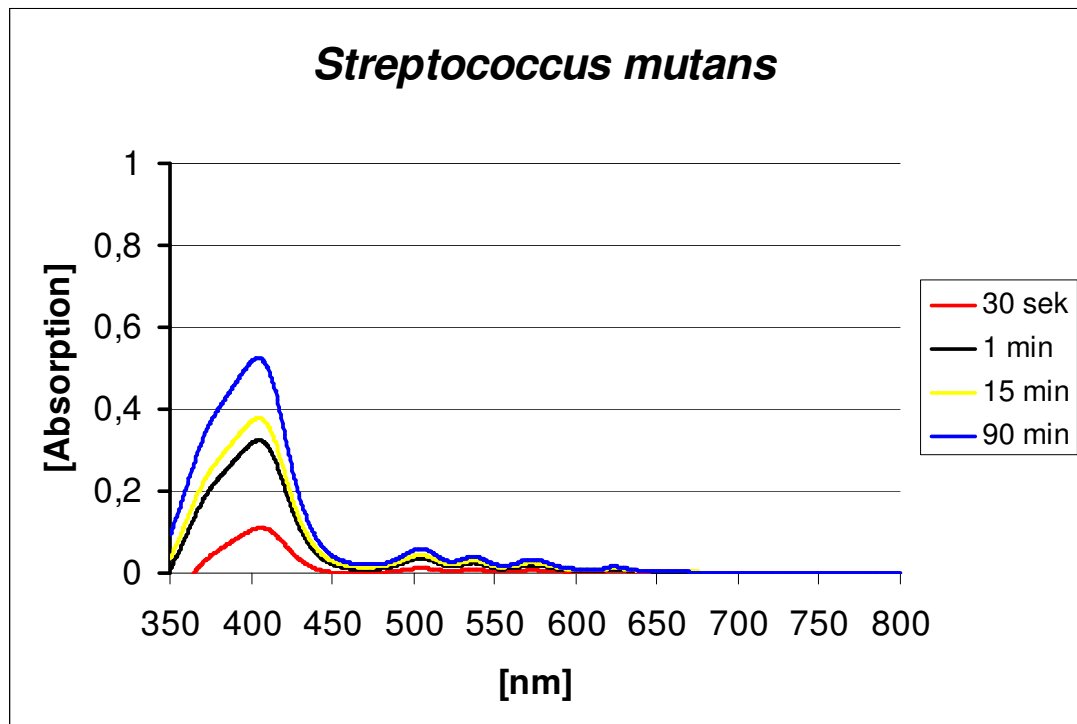
Da mittels Fluoreszenzmikroskopie nur qualitativ beurteilt werden kann, ob Bakterien nach Inkubation mit einem Photosensibilisator fluoreszieren oder nicht, sollte nun in einem zweiten Schritt mit Hilfe der Spektroskopie überprüft werden, ob in Abhängigkeit von der Inkubationszeit eine Anhäufung von Photosan® in Bakterien gegeben ist. Nach Park *et al.* ist eine relative Zunahme der gemessenen Absorption gleichbedeutend mit einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von Molekülen in Bakteriensuspensionen (45).

Bakteriensuspensionen von *S. mutans* wurden mit 0,5 mg/ml Photosan® jeweils 30 sek, 1 min, 10 min und 90 min lang inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen abzentrifugiert und gewaschen. Die somit erhaltenen Pellets wurden resuspendiert und lysiert. Danach wurde die Absorption der Überstände spektrometrisch untersucht.

Nach 30 sek Inkubation war nur eine sehr geringe Absorption zu erkennen. Bei einer Inkubationsdauer von 1 min konnte man nahezu eine Verdreifachung der Absorption detektieren. Ein weiterer Anstieg fand nach 10 min, und eine Verfünffachung des 30-Sekunden-Wertes nach 90 min Inkubation statt (Abb. 7). Für die beiden Gram(-) Bakterienspezies konnten keine spezifischen Absorptionskurven für Photosan® detektiert werden.



Abb. 7



**Abb. 7: Absorptionsspektrum von Photosan® nach Inkubation mit *S. mutans***

Die Bakteriensuspensionen wurden mit 0,5 mg/ml Photosan® jeweils 30 sek, 1 min, 15 min und 90 min inkubiert und gewaschen. Die so erhaltenen Proben wurden einer spektrometrischen Messung unterzogen. Rote Kurve: Absorption nach 30 sek Inkubation; Schwarze Kurve: Absorption nach 1 min; Gelbe Kurve: Absorption nach 15 min; Blaue Kurve: Absorption nach 90 min.

## 6.2. Bestimmung der Phototoxizität von Photosan® bei Gram(+) und Gram(-) Bakterien am Beispiel von *S. mutans* und *E. coli*

Im nächsten Schritt wurde nun die Phototoxizität von Photosan® bei *S. mutans* und *E. coli* hinsichtlich unterschiedlicher Inkubationszeiten und Bestrahlungsdosen untersucht und miteinander verglichen. Folgende Inkubationszeiten und Bestrahlungsdosen wurden verwendet: Nach 5, 15 und 90 min Inkubationszeit wurde jeweils mit den Dosen 4,8 J/cm<sup>2</sup>, 24 J/cm<sup>2</sup>, 72 J/cm<sup>2</sup> und 144 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt, was Bestrahlungszeiten von 2 min, 10 min, 30 min und 60 min entspricht.

Die phototoxische Effektivität gegenüber Bakterien nach Bestrahlung wurde nach bestimmten Richtlinien für Handhygiene im Gesundheitswesen festgelegt (7, 10,

11). Gemäß diesen Richtlinien entsprechen folgende Reduktionen der KBE/ml den angegebenen Zahlen für die Effektivität.

Reduktion der KBE/ml um 1 log<sub>10</sub>-Stufe  $\triangleq$  90% Effektivität

Reduktion der KBE/ml um 3 log<sub>10</sub>-Stufen  $\triangleq$  99,9% Effektivität

Reduktion der KBE/ml um 5 log<sub>10</sub>-Stufen  $\triangleq$  99,999% Effektivität

**Tabelle 1: Übersicht der Ergebnisse**

		Bestrahlung in min											
		2	10	30	60	2	10	30	60	2	10	30	60
Inkubation in min	5	+	+++	++	+++(+)	-	nt	+	-	nt	nt	nt	nt
	15	nt	+++(+)	+++(+)	+++(+)	+	nt	+	+	nt	nt	+	++
	90	++	+++(+)	+++(+)	+++(+)	+	nt	+	++	nt	nt	+	+
		<i>S. mutans</i>				<i>E. coli</i>				<i>A. ac</i>			

Tabelle1: Übersicht der Ergebnisse; +: 1 log<sub>10</sub>-Reduktion; ++: 2 log<sub>10</sub>-Reduktion; +++: 3 log<sub>10</sub>-Reduktion; +++(+): >3 log<sub>10</sub>-Reduktion-: keine Inaktivierung; nt: nicht bestimmt

Die Graphen zu den einzelnen Auswertungen in den Abschnitten 6.2.1 – 6.2.4 sind im Abbildungsverzeichnis (S. 50) zu finden.

### 6.2.1. Vergleich von *S. mutans* und *E. coli* bei 5 min Inkubation

Es wurden Bakteriensuspensionen von *S. mutans* und *E. coli* mit verschiedenen Konzentrationen (0; 1; 5; 10; 100; 500 µg/ml) von Photosan® bei Raumtemperatur 5 min inkubiert und anschließend 2 min, 10 min, 30 min und 60 min bestrahlt. Danach wurden die ausgestrichenen Platten für 24 h im Brutschrank bei 37°C gelagert.

#### **6.2.1.1. Bestrahlungsdauer von 2 min (4,8 J/cm<sup>2</sup>)**

Bei *S. mutans* konnte nach 48 h eine Abnahme der KBE/ml nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration von 500 µg/ml erfolgte eine Reduktion der KBE/ml von 1 log<sub>10</sub>-Stufe nach Bestrahlung (Abb. 8A). Ohne Bestrahlung zeigt der Einsatz von Photosan<sup>®</sup> keinen toxischen Einfluß auf die Überlebensrate (grauer Balken). Bei *E. coli* konnte nach 24 h weder bei den bestrahlten noch bei den unbestrahlten Proben eine Abnahme der KBE/ml festgestellt werden (Abb. 8B).

#### **6.2.1.2. Bestrahlungsdauer von 10 min (24 J/cm<sup>2</sup>)**

Nach Bestrahlung von *S. mutans* kann man nach 48 h eine Reduktion der KBE/ml bei Konzentrationen von Photosan<sup>®</sup> zwischen 1 und 500 µg/ml feststellen. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml sinkt die Zahl der KBE/ml um 2 log<sub>10</sub>-Stufen ab. Bei einer Konzentration von 500 µg/ml ist die 3. log<sub>10</sub>-Stufe noch nicht erreicht (Abb. 9).

#### **6.2.1.3. Bestrahlungsdauer von 30 min (72 J/cm<sup>2</sup>)**

Die KBE/ml von *S. mutans* werden ab einer Konzentration von 5 µg/ml um 1 log<sub>10</sub>-Stufe verringert. Bei 500 µg/ml reduziert sich die Anzahl der KBE/ml um 2 log<sub>10</sub>-Stufen. Wie in den vorhergehenden Versuchen nehmen auch hier die KBE/ml in der Dunkelprobe bei 500 µg/ml ab (Abb. 10A), ohne jedoch ein Niveau zu erreichen, ab dem man von effektiver Inaktivierung sprechen kann.

Nach Ablauf der 24 h im Brutschrank kann man im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 100 µg/ml keine Reduktion der KBE/ml von *E. coli* feststellen. Ab 500 µg/ml geht die Zellvitalität, also die KBE/ml bei bestrahlter und nicht bestrahlter Probe um 1 log<sub>10</sub>-Stufe (Abb. 10B) zurück.

#### **6.2.1.4. Bestrahlungsdauer von 60 min (144 J/cm<sup>2</sup>)**

Hier werden die KBE/ml von *S. mutans* bereits bei den Konzentrationen von 5 und 10 µg/ml um 1 log<sub>10</sub>-Stufe, bei 100 µg/ml um 3 log<sub>10</sub>-Stufen reduziert, und unterscheiden sich bei 500 µg/ml um 4 log<sub>10</sub>-Stufen von der Dunkelprobe. Das bedeutet, dass mehr als 99,99% der Bakterien abgetötet wurden und ein phototoxischer Effekt vorliegt (Abb. 11A).

Bei *E. coli* konnte nach 24 h kaum eine Abnahme der Zellvitalität festgestellt werden, wobei sich die Zahl der KBE in der Dunkelkontrolle bei 500 µg/ml um 1 log<sub>10</sub>-Stufe verringerte (Abb. 11B).

### **6.2.2. Vergleich von *S. mutans* und *E. coli* bei 15 min Inkubation**

In diesem Teil der Untersuchung wurde die Inkubationszeit auf 15 min erhöht, während die Bestrahlungsdosen gleich bleiben. Es wurden Bakteriensuspensionen von *S. mutans* und *E. coli* mit verschiedenen Konzentrationen (0; 1; 5; 10; 100; 500 µg/ml) von Photosan® bei Raumtemperatur 15 min inkubiert und anschließend 2 min, 10 min, 30 min und 60 min bestrahlt. Danach wurden die ausgestrichenen Platten für 24 h im Brutschrank bei 37°C gelagert.

#### **6.2.2.1. Bestrahlungsdauer von 2 min (4,8 J/cm<sup>2</sup>)**

Der KBE-Wert von *E. coli* wird nach 24 h bei der Konzentration von 100 µg/ml um 1 log<sub>10</sub>-Stufe reduziert. Bei 500 µg/ml erfolgt keine weitere Abnahme der KBE/ml. Dabei konnte kein Unterschied hinsichtlich der Abnahme der KBE/ml zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Proben festgestellt werden (Abb. 12). Der Versuch wurde mit *S. mutans* nicht durchgeführt.

#### **6.2.2.2. Bestrahlungsdauer von 10 min (24 J/cm<sup>2</sup>)**

Bei 5 µg/ml reduzieren sich die KBE/ml von *S. mutans* um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, während der Wert der Dunkelprobe noch konstant bleibt. Ab einer Konzentration von 10 µg/ml sinkt die Zahl der KBE/ml um eine weitere log<sub>10</sub>-Stufe. Bei 100 µg/ml und 500 µg/ml beträgt die Abnahme der KBE/ml 5 log<sub>10</sub>-Stufen, was bedeutet, dass 99,999% der Bakterien abgetötet wurden. Auch hier nimmt die Anzahl der KBE/ml in der Dunkelkontrolle ab. Die Zellvitalität im nicht bestrahlten Teil der Versuchsreihe fängt bei einem Konzentrationswert von 10 µg/ml an zu sinken und ist bei 500 µg/ml mehr als eine log<sub>10</sub>-Stufe niedriger als der ursprüngliche Wert, was für eine geringe Dunkeltoxizität von Photosan® spricht (Abb. 13).

#### **6.2.2.3. Bestrahlungsdauer von 30 min (72 J/cm<sup>2</sup>)**

Bei Konzentrationen über 100 µg/ml erreicht die Effektivität bei *S. mutans* über 99,9%, da die Anzahl der KBE/ml um mehr als 3 log<sub>10</sub>-Stufen gesunken ist. Eine Erhöhung der Konzentration auf 500 µg/ml lässt die Zellaktivität um eine weitere log<sub>10</sub>-Stufe sinken und die Toxizität bzw. die Effektivität auf 99,99% steigen. Die KBE/ml in der Dunkelprobe bleiben konstant und sinken bei 500 µg/ml um 2

log<sub>10</sub>-Stufen, was wiederum auf die Dunkeltoxizität des Photosensibilisators hinweist (Abb. 14A).

Im Vergleich zu *S. mutans* konnte beim Gram(-) Bakterium *E. coli* nach 24 h kein phototoxischer Effekt festgestellt werden. Bei höheren Konzentrationen von Photosan<sup>®</sup>, also bei 100 und 500 µg/ml wurden die KBE/ml von bestrahlter und nicht bestrahlter Probe um 1-2 log<sub>10</sub>-Stufen reduziert (Abb. 14B). Es liegt also auch hier ein dunkeltoxischer Effekt vor.

#### **6.2.2.4. Bestrahlungsdauer von 60 min (144 J/cm<sup>2</sup>)**

Bei einer Bestrahlungsdauer von 60 min kann bei 5 µg/ml ein phototoxischer Effekt auf *S. mutans* nachgewiesen werden. Bis zur Konzentration von 500 µg/ml sinkt die Anzahl der KBE/ml um 4 log<sub>10</sub>-Stufen (Effektivität von 99,99%). Auch die Vitalität der Dunkelkontrolle beginnt ab einem Konzentrationswert von 100 µg/ml abzunehmen und liegt beim höchsten Konzentrationswert des Photosensibilisators 1 log<sub>10</sub>-Stufe niedriger (Abb. 15).

Bei *E. coli* lässt sich auch bei längerer Bestrahlungsdauer kein phototoxischer Effekt von Photosan<sup>®</sup> detektieren. Wie bei den vorhergehenden Versuchen ist im Konzentrationsbereich von 100 bis 500 µg/ml eine Abnahme der Zellvitalität zu sehen, die unabhängig von der Bestrahlung ist (Abb. 16).

#### **6.2.3. Vergleich von *S. mutans* und *E. coli* bei 90 min Inkubation**

Es wurden Bakteriensuspensionen von *S. mutans* und *E. coli* mit verschiedenen Konzentrationen (0; 1; 5; 10; 100; 500 µg/ml) von Photosan<sup>®</sup> bei Raumtemperatur 90 min inkubiert und anschließend 2 min, 10 min, 30 min und 60 min bestrahlt. Danach wurden die ausgestrichenen Platten für 24 h im Brutschrank bei 37°C gelagert.

##### **6.2.3.1. Bestrahlungsdauer von 2 min (4,8 J/cm<sup>2</sup>)**

*S. mutans* zeigt bei einer Konzentration von 5 µg/ml die erste Reduktion nach 24 h. Die KBE/ml nehmen bis zur Konzentration von 500 µg/ml um 2 log<sub>10</sub>-Stufen ab. Ohne Bestrahlung zeigt sich der phototoxische Effekt des Photosensibilisators bei 100 µg/ml, und bei 500 µg/ml tritt eine Reduktion der KBE/ml von knapp 2 log<sub>10</sub>-Stufen ein (Abb. 17).

Die KBE/ml von *E. coli* erfahren nach 24 h bei der Konzentration von 100 µg/ml eine Reduktion um 1 log<sub>10</sub>-Stufe. Bei 500 µg/ml verkleinert sich der KBE-Wert erneut. Die Zellvitalität unterscheidet sich nicht bei bestrahlter und unbestrahlter Probe. Es ist also hier keine Toxizität aufgrund von Bestrahlung zu erkennen (Abb. 18).

#### **6.2.3.2. Bestrahlungsdauer von 10 min (24 J/cm<sup>2</sup>)**

Bei *S. mutans* zeigt sich im Bereich von 5 µg/ml die erste Reduktion der KBE/ml um eine halbe log<sub>10</sub>-Stufe. Im Konzentrationsbereich von 10 µg/ml wurden die KBE/ml um 1 log<sub>10</sub>-Stufe, bei 100 µg/ml um 3 log<sub>10</sub>-Stufen und bei 500 µg/ml um mehr als 4 log<sub>10</sub>-Stufen reduziert. Die phototoxische Effektivität liegt also im Bereich von 99,99%.

Die KBE-Werte folgen der Tendenz, im Bereich niedriger Konzentrationen gleich hoch zu bleiben, und sinken im Bereich von 100 µg/ml und 500 µg/ml um 1 log<sub>10</sub>-Stufe. Die Toxizität im Dunkeln beträgt demnach 90% (Abb. 19).

Da nach 60 und 2 min Bestrahlungszeit (144 J/cm<sup>2</sup> und 4,8 J/cm<sup>2</sup>) kein phototoxischer Effekt bei *E. coli* festgestellt werden konnte, wurde im nächsten Schritt statt für 10 min (24 J/cm<sup>2</sup>) 30 min lang, also mit 72 J/cm<sup>2</sup>, bestrahlt um einen möglichen toxischen Effekt von Photosan<sup>®</sup> zu detektieren.

#### **6.2.3.4. Bestrahlungsdauer von 30 min (72 J/cm<sup>2</sup>)**

Nach Bestrahlung von *S. mutans* ist die phototoxische Aktivität in der Zellvitalität bei 5 µg/ml zu erkennen. Im Konzentrationsbereich von 10 µg/ml bis 100 µg/ml nimmt die Zahl der KBE/ml erst um 1 log<sub>10</sub>-Stufe und dann um knapp 4 log<sub>10</sub>-Stufen ab. Bei einer Konzentration von 500 µg/ml sinkt der KBE-Wert um 7 log<sub>10</sub>-Stufen, eine besonders starke Reduktion der KBE/ml; die Effektivität liegt bei 99,9999%. Die Zellvitalität der Dunkelkontrolle bleibt bei den niedrigen Konzentrationen konstant und sinkt bei 500 µg/ml ab (Abb. 20).

Bei *E. coli* lässt sich auch bei längerer Bestrahlungsdauer kein phototoxischer Effekt detektieren. Wie bei den vorhergehenden Versuchen ist in den hochkonzentrierten Bereichen eine Abnahme der Zellvitalität, die unabhängig von der Bestrahlung ist, festzustellen (Abb. 21).

#### **6.2.3.5. Bestrahlungsdauer von 60 min (144 J/cm<sup>2</sup>)**

Bei einer 60 min anhaltenden Bestrahlung von *S. mutans* konnte nach 48 h bei einer Konzentration von 1 µg/ml kommt es zu keiner Reduktion der KBE/ml. Bei einer Konzentration von 5 µg/ml werden die KBE/ml um 3 log<sub>10</sub>-Stufen reduziert. Ab 10 µg/ml liegt der KBE-Wert unterhalb der Nachweisgrenze. Die Werte für die KBE der Dunkelproben bleiben in den niedrig konzentrierten Bereichen unverändert und nehmen erst bei 100 µg/ml und 500 µg/ml um 1-2 log<sub>10</sub>-Stufen ab (Abb. 22).

Beim Gram(-) Bakterium *E. coli* konnte nach 24 h kein phototoxischer Effekt festgestellt werden. Bei hoch konzentriertem Einsatz von Photosan<sup>®</sup>, also bei 100 und 500 µg/ml, wurden die KBE/ml von bestrahlter und nicht bestrahlter Probe um 1-2 log<sub>10</sub>-Stufen reduziert (Abb. 23).

#### **6.2.4. Bestimmung der Phototoxizität von Photosan<sup>®</sup> bei *A. ac***

Einen wichtigen Vertreter der parodontalpathogenen Leitkeime stellt das ebenfalls Gram(-) anaerobe Bakterium *A. ac* dar. Die Kultivierung musste in einem Anaerobiergefäß ablaufen, um für den KBE-assay geeignete Ergebnisse zu liefern. Beim Zentrifugieren der Bakteriensuspensionen mit 3000 Upm konnte kein Pellet erzielt werden. Wurde länger zentrifugiert, zeigte sich, dass die Bakterien abgetötet wurden. Dies wurde mit Hilfe des KBE-assays überprüft (Daten nicht gezeigt). Um dennoch Versuche mit *A. ac* durchführen zu können wurde auf das Zentrifugieren verzichtet und die Bakteriensuspensionen im Nährmedium mit dem Photosensibilisator inkubiert.

##### **6.2.4.1. Phototoxizität von Photosan<sup>®</sup> bei 15 min Inkubation und 30 min Bestrahlung (72 J/cm<sup>2</sup>)**

Im Gegensatz zu *E. coli* reagierte *A. ac* auf die phototoxische Aktivität von Photosan<sup>®</sup>. Die erste erkennbare Reduktion der KBE/ml findet bei einer Konzentration von 10 µg/ml statt und liegt bei 500 µg/ml 2 log<sub>10</sub>-Stufen unterhalb des Ausgangswertes. Diese Abnahme der Zellvitalität ist gleichzusetzen mit einer Effektivität von 99%. Der Wert der Dunkelprobe bleibt unverändert (Abb. 24).

#### **6.2.4.2. Phototoxizität von Photosan<sup>®</sup> bei 15 min Inkubation und 60 min Bestrahlung (144 J/cm<sup>2</sup>)**

*A. ac* zeigte nach 60 min Bestrahlung eine Reaktion auf die phototoxische Aktivität des Photosensibilisators. Im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 5 µg/ml verändert sich die Zahl der KBE/ml kaum. Bei 10 µg/ml erfährt die Zellvitalität eine Reduktion um 1-2 log<sub>10</sub>-Stufen und bleibt bei 100 und 500 µg/ml auf diesem Stand. Die KBE/ml in der Dunkelkontrolle bleiben konstant (Abb. 25).

#### **6.2.4.3. Phototoxizität von Photosan<sup>®</sup> bei 90 min Inkubation und 30 min Bestrahlung (72 J/cm<sup>2</sup>)**

48 h nach Bestrahlung zeigt sich bei *A. ac* eine Reduktion der KBE/ml im Konzentrationsbereich von 10 µg/ml. Hier sinkt der KBE-Wert um 1 log<sub>10</sub>-Stufe, steigt bei 100 µg/ml wieder etwas an und liegt bei 500 µg/ml 2 log<sub>10</sub>-Stufen unterhalb des Ausgangswertes. Die Werte der Dunkelprobe sinken bei 500 µg/ml um 1 log<sub>10</sub>-Stufe (Abb. 26).

#### **6.2.4.4. Phototoxizität von Photosan<sup>®</sup> bei 90 min Inkubation und 60 min Bestrahlung (144 J/cm<sup>2</sup>)**

Im Gegensatz zu *E. coli* reagierte *A. ac* auf die phototoxische Aktivität von Photosan<sup>®</sup>. Die erste geringe Reduktion der KBE/ml findet bei der Konzentration von 10 µg/ml statt. Die Zellvitalität nimmt bei 100 µg/ml bereits um eine halbe log<sub>10</sub>-Stufe ab und liegt bei 500 µg/ml 2 log<sub>10</sub>-Stufen unterhalb des Ausgangswertes, was einer phototoxischen Effektivität von 99% entspricht. Auch hier sinkt der Wert der Dunkelprobe ab einem Konzentrationswert von 100 µg/ml (Abb. 27).



## 7. Diskussion

Eine große Anzahl von oralen Erkrankungen entstehen durch Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilze (36, 37, 63). Vor allem sind hier Parodontitis und Karies zu nennen. Während Karies meist durch Entfernung erkrankten Gewebes und Füllung des entstandenen Defekts mit vorausgehender Desinfektion behandelt wird, werden bei der Parodontitistherapie neben der mechanischen Reinigung von Zahn- und Wurzeloberflächen ebenfalls Desinfektionsmittel und bei schwerwiegenden Fällen topische oder systemische Antibiotika eingesetzt (36, 37, 63, 84, 91, 96). Die systemische Antibiose ist oft von Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Magen- und Darmproblemen (3, 8, 15) begleitet, die vom Patienten als unangenehm empfunden werden. Bei Schwangeren oder Patienten, die allergisch auf bestimmte Antibiotika reagieren, kommt eine systemische Antibiose erst gar nicht zur Anwendung. Problematisch sind auch die Zunahme der Resistenzentwicklung der pathogenen Keime und die geringe Medikamentenkonzentration im Sulcusfluid. Daher könnte die PIB als Unterstützung der oben genannten konventionellen Behandlungskonzepte einen großen und innovativen Beitrag leisten. In dieser Arbeit wurden die physikalisch-chemischen und mikrobiologischen Grundlagen eines neuen Photosensibilisators zur Photodynamischen Inaktivierung bei zahnmedizinisch relevanten Leitkeimen untersucht.

Im Rahmen dieser Studie wurde als neuer Photosensibilisator erstmals Photosan<sup>®</sup>, ein bereits für die „klassische“ Photodynamische Therapie zugelassenes Medizinprodukt, zur Inaktivierung von Bakterien eingesetzt. Die Aufnahme des Farbstoffes in den Bakterien konnte durch spektroskopische Nachweisverfahren ermittelt werden. Demnach wurde Photosan<sup>®</sup> zwar vom Gram(+) *S. mutans* aufgenommen, während beim Gram(-) *E. coli* keine Fluoreszenzsignale erkennbar waren. In den Experimenten zur Phototoxizität konnte gezeigt werden, dass Photosan<sup>®</sup> auf den Gram(+) Keim *S. mutans* phototoxisch wirkte. D.h. es konnten Bedingungen hinsichtlich der Inkubationszeit von Photosan<sup>®</sup> sowie der Bestrahlungsdosis definiert werden, bei denen mehr als 99,9% der Bakterien abgetötet werden konnten. Im Gegensatz dazu zeigten Experimente zur Photodynamischen Inaktivierung der gram-negativen Keime *E. coli* und *A. ac* keinen ausreichenden Erfolg.

## 7.1. Phototoxizität von Photosan®

### 7.1.1. Phototoxizität bei Gram(+) Bakterien

Die phototoxische Effektivität wird allgemein durch die Reduktion von Koloniebildenden Einheiten beschrieben, wobei diese in  $\log_{10}$ -Stufen angegeben wird. Von einem medizinisch relevanten Effekt spricht man ab einer Verringerung der koloniebildenden Einheiten um mindestens 3  $\log_{10}$ -Stufen, was einer Effektivität von 99,9% entspricht (47).

Der phototoxische Effekt von Photosan® stellt sich nicht gleichermaßen bei Gram(+) und Gram(-) Bakterien ein, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Im Gegensatz zu Gram(+) Bakterien, konnte bei Gram(-) Bakterien keine Reduktion um mindestens 3  $\log_{10}$  Stufen nachgewiesen werden. Der Grund hierfür ist im Aufbau der bakteriellen Zellwände zu suchen, in deren Aufbau und Zusammensetzung sich Gram(+) und Gram(-) Bakterien unterscheiden.

Bei Gram(+) Bakterien wird das Zytoplasma durch eine Plasmamembran umgeben, die aus einer Lipid-Doppelschicht besteht. Umgeben wird diese durch ein dickes Peptidoglycangerüst, das als Zellwandhauptstrukturkomponente zu sehen ist. Sie hat bei Gram(+) Bakterien eine Dicke von 20-80 nm. Zwischen diesen beiden Schichten befindet sich der periplasmatische Raum. Das Zytoplasma von Gram(-) Bakterien ist ebenfalls von einer Plasmamembran umgeben. Jedoch befindet sich peripher um die nur 2-3 nm dicke und in den periplasmatischen Raum eingebettete Peptidoglycanschicht eine zusätzliche Lipid-Doppelmembran, die charakteristisch für Gram(-) Bakterien ist.

In diversen Studien zur Passage von Polysacchariden und antibakteriellen Peptiden konnte festgestellt werden, dass es Substanzen gibt, die durch die teilweise bis zu 100 Schichten dicke Peptidoglycanschicht der Gram(+) Bakterien diffundieren können, solange diese eine Molekülgröße von 30 bis 57 kDa nicht überschreiten (28, 81, 93). Sind diese Substanzen hydrophil, findet die Diffusion in die Zellwand leichter statt (72, 100). Der Photosensibilisator Photosan® ist ein polares, hydrophiles Molekül mit einer Größe von 1 kDa. Aufgrund dieser Tatsache gelingt ihm die Passage der Peptidoglycanschicht evtl. durch passive Diffusion. Dies müsste durch Versuche bei 4°C bestimmt werden, da bei dieser Temperatur aktive Transportmechanismen gehemmt sind.

Inkubiert man das Gram(+) Bakterium *S. mutans* mit Photosan<sup>®</sup> und betrachtet einzelne Bakterien unter dem Fluoreszenzmikroskop, so können deutliche Signale detektiert werden, die zeigen, dass der Photosensibilisator von den Bakterien aufgenommen wurde. Anschließend durchgeführte Untersuchungen zur Absorptionsänderung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bestätigen diese Annahme. Nach der Inkubation von *S. mutans* mit Photosan<sup>®</sup> steigt der Absorptionswert der Bakterienlösung stetig mit der Dauer der Inkubation. Auch der Phototoxizitätstest stützt diese Annahme. In den einzelnen Tests konnte gezeigt werden, dass Photosan<sup>®</sup> einen deutlich phototoxischen Effekt von 99% bis 99,99% im Konzentrationsbereich von 100-500 µg/ml auf das Gram(+) Bakterium *S. mutans* hatte.

Die Passage von Photosan<sup>®</sup> als polares Molekül durch die bakterielle Zellwand bis hin zur Außenseite der Zytoplasmamembran ist also möglich. Unwahrscheinlich jedoch ist das Durchqueren der Plasmamembran und damit das Eindringen des Photosensibilisators in ins Innere der Zelle. Die Lipid-Doppelschicht, welche das Zytoplasma der Gram(+) Bakterien umgibt, stellt für geladene Moleküle eine nicht permeable Barriere dar, die nur durch aktive Transportmechanismen überwunden werden kann. Zu nennen sind hier Carrier-Proteine (72, 100). Bei Gram(+) Bakterien wird der Farbstoff nicht in die Zelle transportiert, sondern akkumuliert an der Außenseite Zytoplasmamembran. Bei Bestrahlung des Photosensibilisators bildet sich hier der reaktive Singulett-Sauerstoff und fügt der Zytoplasmamembran einen irreversiblen oxidativen Schaden zu, der letztendlich zur Lyse der Zelle führt. Photosensibilisator und reaktiver Sauerstoff bilden ein System und kommen daher nur miteinander gekoppelt zur Wirkung. Aus diesem Grund ist der Ort der Zellschädigung auch der Ort, wo sich der Farbstoff vorab akkumuliert hat. Die Zellenzerstörende Aktivität ist örtlich begrenzt, da Singulett-Sauerstoff einerseits nur eine sehr kurze Strecke durch Diffusion zurücklegen kann und andererseits seine Halbwertszeit in Wasser lediglich 4 µs beträgt (75).

### 7.1.2. Phototoxizität bei Gram(-) Bakterien

Im Fall der Gram(-) Bakterien wird die sehr dünne Peptidoglycanschicht von einer zusätzlichen äußeren Zellmembran umgeben. Diese Lipid-Doppelschicht stellt eine für geladene Moleküle unüberwindbare Permeabilitätsbarriere dar. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass neutrale Photosensibilisatoren und solche mit negativer Ladung gut an Gram(+) Bakterien akkumulieren, jedoch nicht an Gram(-). Es gibt jedoch verschiedene positiv geladene chemische Stoffklassen, wie Phenotiazine, Phtalocyanine und Porphyrine, die effizient Gram(+) und Gram(-) Bakterien abtöten können. In diversen Studien konnte auch gezeigt werden, dass Moleküle mit positiver Ladung in der Lage sind, bei Gram(-) Bakterien ohne den Zusatz von membranlösenden Substanzen einen phototoxischen Schaden zu verursachen (68).

Grund dafür sind die Ladung und die Hydrationshülle dieser Moleküle, die das Eindringen in die unpolare Kohlenwasserstoffphase der Zellmembran unmöglich machen. Kleine und unpolare Moleküle wie molekularer Sauerstoff oder Kohlendioxid können die Permeabilitätsbarriere der Gram(-) Bakterien am besten überwinden. Bei polaren, aber ungeladenen Molekülen ist die Permeabilität abhängig von der Molekülgröße (2). Daher kann für die meisten Antibiotika und Photosensibilisatoren die äußere Plasmamembran der Gram(-) Bakterien als eine effektive Barriere angesehen werden (80, 81, 108).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, wurde der Farbstoff Photosan<sup>®</sup> nicht von den Gram(-) Bakterien *E. coli* und *A. ac* aufgenommen. Inkubierte man *E. coli* mit dem Photosensibilisator, so konnten durch Fluoreszenzmikroskopie keine fluoreszierenden Signale entdeckt werden. Bei der Inkubation von *E. coli* und *A. ac* mit Photosan<sup>®</sup> konnte im Phototoxizitätstest keine effektive Reduktion durch Bestrahlung der Bakteriensuspensionen beobachtet werden. Es konnte lediglich durch die Abnahme der Bakterienzahl in der Vergleichsprobe ohne Bestrahlung festgestellt werden, dass der Photosensibilisator in hoher Konzentration einen dunkeltoxischen Effekt aufweist. Die Diffusion von Photosan<sup>®</sup> durch die Zellwand Gram(-) Bakterien ist demnach sehr unwahrscheinlich.

Es stellt sich die Frage, ob Photosan<sup>®</sup> wegen seiner Größe oder aufgrund seiner neutralen Struktur die bakterielle Zellwand nicht passieren kann.

In der äußeren Membran von Gram(-) Bakterien sind porenbildende Proteine, die sogenannten Porine, integriert. Durch diese Porine ist es manchen hydrophilen Substanzen bzw. Molekülen möglich, die permeabilitätshemmende Lipid-Doppelschicht zu überwinden (72, 100). Bei Untersuchungen über das Penetrationsverhalten von Substanzen wie Glycopeptiden, Polysacchariden und Antibiotika konnte gezeigt werden, dass diese die Zellwand von Gram(-) Bakterien über oben genannte Porine passieren. Allerdings gelingt dies nur hydrophilen Stoffen mit einer Molekülgröße bis zu 0,6-0,7 kDa (80, 81, 109). Photosan<sup>®</sup> dagegen hat ein Molekulargewicht von ~ 1000 Da, daher ist es unwahrscheinlich, dass Photosan<sup>®</sup> die äußere Zellmembran der Gram(-) Bakterien durch die vorhandenen Porine durchdringen kann.

### 7.1.3. Phototoxizität bei *A. ac*

Das Gram(-) Bakterium *A. ac* gilt als Leitkeim in der Parodontologie und damit als Hauptverursacher von bakterieninduzierten Erkrankungen des Parodonts, der Parodontitiden. Vor allem steht die lokalisierte aggressive Parodontitis im Zusammenhang mit *A. ac*. Der Krankheitsverlauf ist gekennzeichnet durch eine schnelle Zerstörung des Zahnhalteapparates. Betroffen von der Krankheit sind 14% der 45-54 Jährigen und 23% der 65-74 Jährigen (36, 37).

Neben der Überprüfung, ob *A. ac* mit Hilfe der Photodynamischen Therapie im Zusammenhang mit Photosan<sup>®</sup> und sichtbarem Licht abgetötet werden kann, musste ein geeignetes Kultivierungsverfahren entwickelt werden, da durch Zentrifugieren der Bakteriensuspensionen für 15 min mit 3000 Upm kein Pellet erzielt werden konnte. Nach längerem Zentrifugieren wurden die Bakterien abgetötet.

Durch mehrere Versuche, die ohne Waschen und Zentrifugieren der Bakteriensuspensionen durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass eine Photodynamische Inaktivierung der Bakterien möglich war. Die Zahl der koloniebildenden Einheiten sank allerdings nur um 1 log<sub>10</sub>-Stufe.

Wie beim Gram(-) Referenzkeim *E. coli* erläutert, führte der Phototoxizitätstest bei *A. ac* jedoch zu keiner effektiven Abtötung der Bakterien. Auch bei *A. ac* ist der Grund für die Ineffektivität der PIB in der Zellwand der Gram(-) Bakterien zu suchen.

Um Gram(-) Keime dennoch durch antibakterielle Photodynamische Therapie abtöten zu können, wäre zu überlegen, ob durch eine Veränderung der Parameter, wie die Art der Lichtquelle (Wellenlänge und Energiedosis) oder durch Zusatz von Agenzien, welche die Durchlässigkeit der bakteriellen Zellwand erhöhen, effektivere Versuchsbedingungen geschaffen werden könnten.

Verschiebt man das Emissionsspektrum der Lichtquelle in den kurzwelligen Bereich von 400-475 nm so kann das Absorptionsmaximum von Photosan® in der Soretbande (Abb. 4 der Einleitung) genutzt werden. Dadurch verringert sich allerdings die Eindringtiefe der Lichtstrahlen (69).

Nitzan *et al.* (1992) konnten zeigen, dass durch die Anwesenheit von Polymixin-B-Nonapeptid (PMNP) die antibakterielle Photodynamische Therapie bei Gram(-) Bakterien wie *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* möglich ist (70). Weiterhin konnte Vacra (1992) eine Permeabilisierung der äußeren bakteriellen Zellwandmembran durch Zugabe von EDTA beobachten (108).

EDTA ist ein in der Zahnheilkunde bewährtes und vielfach eingesetztes Präparat zum Lösen der Schmierschicht (smear layer) in der Endodontologie und zum Konditionieren der Knochen- bzw. Wurzeloberflächen bei der GTR (Gesteuerte Geweberegeneration), was es ebenfalls zum Einsatz bei der antibakteriellen Photodynamischen Therapie prädestiniert. Auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit wurde darum im Rahmen eines Folgeprojektes der zusätzliche Einsatz von EDTA bei der Inkubation von Gram(-) Bakterien mit Photosan® untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung von EDTA eine Effektivität von mehr als 99,9% bei der phototoxischen Inaktivierung von *A. ac* erreicht werden konnte (69).

## 8. Zusammenfassung und Ausblick

In der zahnärztlichen Praxis ist man als Behandler mit Karies- und Parodontitisrezidiven konfrontiert, die durch suboptimale Desinfektion von Kavitäten bzw. parodontalen Taschen verursacht werden können. In der Parodontitistherapie wird bei besonders schweren Krankheitsbildern und refraktären Entzündungen der Einsatz von Antibiotika empfohlen. Wegen des vermehrten Auftretens von Antibiotikaresistenzen, Nebenwirkungen und zum Teil sehr niedriger Medikamentenkonzentration im Sulcus könnte die photodynamische Reaktion eine gute Ergänzung zur konventionellen Behandlungsstrategie darstellen. In der Kariologie könnte evtl. durch Anwendung Photodynamischer Therapie bei der Exkavierung selektiver vorgegangen und so substanzschonender gearbeitet werden. In der Kariesprophylaxe könnte die PIB eingesetzt werden, um schwer zugängliche Kariesprädektionsstellen aufzuspüren und adäquat zu reinigen und zu desinfizieren.

In vorliegender Arbeit wurde die Effektivität der Photodynamischen Inaktivierung von Bakterien anhand von Leitkeimen in Kariologie und Parodontologie unter Verwendung von Photosan<sup>®</sup> untersucht. Versuche zur Phototoxizität zeigten, dass Photosan<sup>®</sup> auf den Gram(+) *S. mutans* phototoxisch wirkte. Bei Gram(-) Bakterien, wie *A. ac* und *E. coli* konnte bei den hier angewendeten Versuchsbedingungen kein phototoxischer Effekt durch Photosan<sup>®</sup> detektiert werden. Bei den Versuchen zur Aufnahme des Photosensibilisators in die Bakterienzelle wurde gezeigt, dass Photosan<sup>®</sup> vom Gram(+) *S. mutans*, aber nicht von Gram(-) Bakterien aufgenommen wurde. Aufgrund der Ergebnisse und Ansätze zur Kultivierung von *A. ac*, die in vorliegender Studie erarbeitet wurden, entstand die Idee, den Versuchsaufbau zu verändern und zu erweitern, um die Zellmembran von Gram(-) Bakterien für Photosensibilisatoren durchlässiger zu machen. In der Arbeitsgruppe von PD Dr. Tim Maisch wurde daher in Zusammenarbeit mit der Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie zusätzlich EDTA verwendet, um die Membranpermeabilität zu erhöhen, sodass auch bei Gram(-) Bakterien eine photodynamische Inaktivierung möglich wurde (69). Auf diese Weise konnten erstmalig Gram(+) und Gram(-) Leitkeime in der Zahnheilkunde mit einer Kombination von Polymerisationslampe, Photosan und EDTA erfolgreich inaktiviert werden. Von Vorteil ist

hier, dass EDTA bereits in der Zahnmedizin zur Anwendung kommt und seit Langem erprobt ist.

## 9. Literaturverzeichnis

1. **al-Tannir, M. A., and H. S. Goodman.** 1994. A review of chlorhexidine and its use in special populations. *Spec Care Dentist* **14**:116-22.
2. **Anderson, N. C., Jr.** 1978. Physiologic basis of myometrial function. *Semin Perinatol* **2**:211-22.
3. **Appleman, M. D., V. L. Sutter, and T. N. Sims.** 1982. Value of antibiotic prophylaxis in periodontal surgery. *J Periodontol* **53**:319-24.
4. **Auschill, T. M., C. A. Koch, M. Wolkewitz, E. Hellwig, and N. B. Arweiler.** 2009. Occurrence and causing stimuli of postoperative sensitivity in composite restorations. *Oper Dent* **34**:3-10.
5. **Aveline, B.** 2001,2. Primary processes in photosensitization mechanisms. *Comprehensive Series in Photoscience*:17-34.
6. **Balakrishnan, M., R. S. Simmonds, and J. R. Tagg.** 2000. Dental caries is a preventable infectious disease. *Aust Dent J* **45**:235-45.
7. **Bardow, A., B. Nyvad, and B. Nauntofte.** 2001. Relationships between medication intake, complaints of dry mouth, salivary flow rate and composition, and the rate of tooth demineralization in situ. *Arch Oral Biol* **46**:413-23.
8. **Beikler T, K. H., Flemmig TF.** 2003. Adjuvante Antibiotika in der Parodontistherapie. *Dtsch Zahnärztl Z* **58**:263-265.
9. **Bertoloni, G., F. Rossi, G. Valduga, G. Jori, H. Ali, and J. E. van Lier.** 1992. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios* **71**:33-46.
10. **Boyce, J. M.** 2004. New insights for improving hand hygiene practices. *Infect Control Hosp Epidemiol* **25**:187-8.
11. **Boyce, J. M., and D. Pittet.** 2002. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Infect Control Hosp Epidemiol* **23**:S3-40.
12. **Braathen, L. R., R. M. Szeimies, N. Basset-Seguin, R. Bissonnette, P. Foley, D. Pariser, R. Roelandts, A. M. Wennberg, and C. A. Morton.** 2007. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. *International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, 2005. J Am Acad Dermatol* **56**:125-43.
13. **Burt, B. A., A. I. Ismail, and S. A. Eklund.** 1985. Periodontal disease, tooth loss, and oral hygiene among older Americans. *Community Dent Oral Epidemiol* **13**:93-6.
14. **Caufield, P. W., Y. Li, and A. Dasanayake.** 2005. Dental caries: an infectious and transmissible disease. *Compend Contin Educ Dent* **26**:10-6.
15. **Checci, L.** 1985. [Methods of medical analysis in periodontal therapy]. *Dent Cadmos* **53**:105, 109-10.



16. **Cousido, M. C., I. Tomas Carmona, L. Garcia-Caballero, J. Limeres, M. Alvarez, and P. Diz.** 2009. In vivo substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. *Clin Oral Investig*.
17. **de Soet, J. J., B. Nyvad, and M. Kilian.** 2000. Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries Res* **34**:486-90.
18. **Dobson, J., and M. Wilson.** 1992. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol* **37**:883-7.
19. **Dougherty, T. J., C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, and Q. Peng.** 1998. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* **90**:889-905.
20. **Duque, C., C. Negrini Tde, N. T. Sacono, D. M. Spolidorio, C. A. de Souza Costa, and J. Hebling.** 2009. Clinical and microbiological performance of resin-modified glass-ionomer liners after incomplete dentine caries removal. *Clin Oral Investig* **13**:465-71.
21. **Eklund, S. A., and B. A. Burt.** 1994. Risk factors for total tooth loss in the United States; longitudinal analysis of national data. *J Public Health Dent* **54**:5-14.
22. **Ekstrand, K. R.** 2004. Improving clinical visual detection--potential for caries clinical trials. *J Dent Res* **83 Spec No C**:C67-71.
23. **Emilson, C. G.** 1994. Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *J Dent Res* **73**:682-91.
24. **Ferraro, M., and A. R. Vieira.** Explaining gender differences in caries: a multifactorial approach to a multifactorial disease. *Int J Dent* **2010**:649643.
25. **Flink, H.** 2007. Studies on the prevalence of reduced salivary flow rate in relation to general health and dental caries, and effect of iron supplementation. *Swed Dent J Suppl*:3-50, 2 p preceding table of contents.
26. **Fluit, A. C., M. R. Visser, and F. J. Schmitz.** 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* **14**:836-71, table of contents.
27. **Fosse, T., I. Madinier, C. Hitzig, and Y. Charbit.** 1999. Prevalence of beta-lactamase-producing strains among 149 anaerobic gram-negative rods isolated from periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol* **14**:352-7.
28. **Friedrich, C. L., D. Moyles, T. J. Beveridge, and R. E. Hancock.** 2000. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2086-92.
29. **Friskén, K. W., T. Higgins, and J. M. Palmer.** 1990. The incidence of periodontopathic microorganisms in young children. *Oral Microbiol Immunol* **5**:43-5.
30. **Garcia-Caballero, L., I. T. Carmona, M. C. Gonzalez, J. L. Posse, J. L. Taboada, and P. D. Dios.** 2009. Evaluation of the substantivity in saliva of different forms of application of chlorhexidine. *Quintessence Int* **40**:141-4.
31. **Garvey, L. H., J. Roed-Petersen, and B. Husum.** 2001. Anaphylactic reactions in anaesthetised patients - four cases of chlorhexidine allergy. *Acta Anaesthesiol Scand* **45**:1290-4.
32. **Gebel, J.** 2002. Anforderungskatalog für die Aufnahme von chemischen Desinfektionsverfahren in die Desinfektionsmittel-Liste der DGfHM. Desinfektionsmittel-Kommission der DGfHM:5-22.

33. **Halliwell, B., and J. M. Gutteridge.** 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* **1**:1396-7.
34. **Handal, T., D. A. Caugant, and I. Olsen.** 2003. Antibiotic resistance in bacteria isolated from subgingival plaque in a norwegian population with refractory marginal periodontitis. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1443-6.
35. **Handal, T., I. Olsen, C. B. Walker, and D. A. Caugant.** 2004. Beta-lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **19**:303-8.
36. **Henderson, B.** 2002. Oral bacterial disease and the science of cellular conversation. *J R Soc Med* **95**:77-80.
37. **Henderson, B., M. Wilson, L. Sharp, and J. M. Ward.** 2002. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Med Microbiol* **51**:1013-20.
38. **Herrera, D., A. J. van Winkelhoff, N. Dellemijn-Kippuw, E. G. Winkel, and M. Sanz.** 2000. Beta-lactamase producing bacteria in the subgingival microflora of adult patients with periodontitis. A comparison between Spain and The Netherlands. *J Clin Periodontol* **27**:520-5.
39. **Holm, P.** 1954. The influence of carbon dioxide on the growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Bacterium actinomycetem comitans* Klinger 1912. *Acta Pathol Microbiol Scand* **34**:235-48.
40. **Huber, H.** 1905. Weitere Versuche mit photodynamischen sensibilisierenden Farbstoffen. *Arch. f. Hyg* **54**.
41. **Inamatsu, T., H. Ooshima, M. Fukayama, Y. Masuda, and T. Hatakeyama.** 1992. [Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in geriatric hospital--management for infected decubital ulcer]. *Nippon Rinsho* **50**:1157-62.
42. **Inamatsu, T., H. Ooshima, Y. Masuda, M. Fukayama, K. Adachi, H. Takeshima, and H. Hashimoto.** 1992. [Clinical spectrum of antibiotic associated enterocolitis due to methicillin resistant *Staphylococcus aureus*]. *Nippon Rinsho* **50**:1087-92.
43. **Jacobson, B., and A. Asgari.** 2008. Restorative dentistry for children using a hard tissue laser. *Alpha Omegan* **101**:133-9.
44. **Jepsen, S., Y. Acil, T. Peschel, K. Kargas, and J. Eberhard.** 2008. Biochemical and morphological analysis of dentin following selective caries removal with a fluorescence-controlled Er:YAG laser. *Lasers Surg Med* **40**:350-7.
45. **Jevons, M. P., A. W. Coe, and M. T. Parker.** 1963. Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet* **1**:904-7.
46. **Jones, L. R., and L. I. Grossweiner.** 1994. Singlet oxygen generation by Photofrin in homogeneous and light-scattering media. *J Photochem Photobiol B* **26**:249-56.
47. **Jorgensen, J. H., M. P. Weinstein, A. L. Barry, S. L. Hansen, S. G. Jenkins, J. M. Miller, and J. L. Watts.** 1999. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. *NCCLS* **19**:1-8.
48. **Kaiser, G. E.** 2006. Microbiology Website; THE COMMUNITY COLLEGE OF BALTIMORE COUNTY, CATONSVILLE CAMPUS <http://student.ccbcmd.edu/~gkaiser/welcome.html>.
49. **Kleinberg, I.** 2002. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to

- Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**:108-25.
50. **Knight, B. A., R. Puy, J. Douglass, R. E. O'Hehir, and F. Thien.** 2001. Chlorhexidine anaphylaxis: a case report and review of the literature. *Intern Med J* **31**:436-7.
  51. **Kononen, E., S. Asikainen, S. Alaluusua, M. Kononen, P. Summanen, A. Kanervo, and H. Jousimies-Somer.** 1991. Are certain oral pathogens part of normal oral flora in denture-wearing edentulous subjects? *Oral Microbiol Immunol* **6**:119-22.
  52. **Koolhoven, R. A., and A. J. Plasschaert.** 2003. [Caries profunda: current views and treatment concepts]. *Ned Tijdschr Tandheelkd* **110**:510-5.
  53. **Kornblit, R., M. Bossu, D. Mari, J. P. Rocca, and A. Polimeni.** 2009. Enamel and dentine of deciduous teeth Er:YAG laser prepared. A SEM study. *Eur J Paediatr Dent* **10**:75-82.
  54. **Koubi, S., and H. Tassery.** 2008. Minimally invasive dentistry using sonic and ultra-sonic devices in ultraconservative Class 2 restorations. *J Contemp Dent Pract* **9**:155-65.
  55. **Krautheim, A. B., T. H. Jermann, and A. J. Bircher.** 2004. Chlorhexidine anaphylaxis: case report and review of the literature. *Contact Dermatitis* **50**:113-6.
  56. **Kuriyama, T., D. W. Williams, M. Yanagisawa, K. Iwahara, C. Shimizu, K. Nakagawa, E. Yamamoto, and T. Karasawa.** 2007. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with den-toalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol* **22**:285-8.
  57. **Lamster, I. B., Q. T. Smith, R. S. Celenti, R. E. Singer, and J. T. Grbic.** 1994. Development of a risk profile for periodontal disease: microbial and host response factors. *J Periodontol* **65**:511-20.
  58. **Lavespere, J. E., R. A. Yukna, D. A. Rice, and D. M. LeBlanc.** 1996. Root surface removal with diamond-coated ultrasonic instruments: an in vitro and SEM study. *J Periodontol* **67**:1281-7.
  59. **Levy, S. B.** 2002. The 2000 Garrod lecture. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* **49**:25-30.
  60. **Levy, S. B.** 1998. Antimicrobial resistance: bacteria on the defence. Resistance stems from misguided efforts to try to sterilise our environment. *Bmj* **317**:612-3.
  61. **Listgarten, M. A., C. H. Lai, and V. Young.** 1993. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J Periodontol* **64**:155-61.
  62. **Lockhart, A. S., and C. C. Harle.** 2001. Anaphylactic reactions due to chlorhexidine allergy. *Br J Anaesth* **87**:940-1; author reply 941.
  63. **Loe, H.** 2000. Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *Int Dent J* **50**:129-39.
  64. **Loesche, W. J., and N. S. Grossman.** 2001. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clin Microbiol Rev* **14**:727-52, table of contents.
  65. **Machiulskiene, V., B. Nyvad, and V. Baelum.** 2001. Caries preventive effect of sugar-substituted chewing gum. *Community Dent Oral Epidemiol* **29**:278-88.
  66. **Magnusson, I., and C. B. Walker.** 1996. Refractory periodontitis or recurrence of disease. *J Clin Periodontol* **23**:289-92.

67. **Maisch, T., C. Bosl, R. M. Szeimies, N. Lehn, and C. Abels.** 2005. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1542-52.
68. **Maisch, T., R. M. Szeimies, G. Jori, and C. Abels.** 2004. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem Photobiol Sci* **3**:907-17.
69. **Maisch, T., J. Wagner, V. Papastamou, H. J. Nerl, K. A. Hiller, R. M. Szeimies, and G. Schmalz.** 2009. Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry in vitro. *J Appl Microbiol*.
70. **Malik, Z., H. Ladan, Y. Nitzan, and B. Ehrenberg.** 1990. The bactericidal activity of a deuteroporphyrin-hemin mixture on gram-positive bacteria. A microbiological and spectroscopic study. *J Photochem Photobiol B* **6**:419-30.
71. **Mandel, I. D.** 1994. Antimicrobial mouthrinses: overview and update. *J Am Dent Assoc* **125 Suppl 2**:2S-10S.
72. **Martonosi, A., G. Kracke, K. A. Taylor, L. Dux, and C. Peracchia.** 1985. The regulation of the Ca<sup>2+</sup> transport activity of sarcoplasmic reticulum. *Soc Gen Physiol Ser* **39**:57-85.
73. **Matuliene, G., B. E. Pjetursson, G. E. Salvi, K. Schmidlin, U. Bragger, M. Zwahlen, and N. P. Lang.** 2008. Influence of residual pockets on progression of periodontitis and tooth loss: results after 11 years of maintenance. *J Clin Periodontol* **35**:685-95.
74. **McCoy, L. C., C. J. Wehler, S. E. Rich, R. I. Garcia, D. R. Miller, and J. A. Jones.** 2008. Adverse events associated with chlorhexidine use: results from the Department of Veterans Affairs Dental Diabetes Study. *J Am Dent Assoc* **139**:178-83.
75. **Meisel, P., and T. Kocher.** 2005. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B* **79**:159-70.
76. **Meyer, D. H., and P. M. Fives-Taylor.** 1998. Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. *Curr Opin Microbiol* **1**:88-95.
77. **Minnock, A., D. I. Vernon, J. Schofield, J. Griffiths, J. H. Parish, and S. T. Brown.** 1996. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria. *J Photochem Photobiol B* **32**:159-64.
78. **Moan, J., and K. Berg.** 1991. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* **53**:549-53.
79. **Moreira, R. M., and E. J. Feres-Filho.** 2007. Comparison between full-mouth scaling and root planing and quadrant-wise basic therapy of aggressive periodontitis: 6-month clinical results. *J Periodontol* **78**:1683-8.
80. **Nikaido, H.** 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:593-656.
81. **Nikaido, H., and M. Vaara.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* **49**:1-32.
82. **Pahkla, E. R., T. Koppel, P. Naaber, M. Saag, and K. Loivukene.** 2006. The efficacy of non-surgical and systemic antibiotic treatment on smoking and non-smoking periodontitis patients. *Stomatologija* **8**:116-21.
83. **Pereira-Cenci, T., M. S. Cenci, Z. Fedorowicz, and M. A. Marchesan.** 2009. Antibacterial agents in composite restorations for the prevention of dental caries. *Cochrane Database Syst Rev*:CD007819.

84. **Preshaw, P. M.** 2004. Antibiotics in the treatment of periodontitis. *Dent Update* **31**:448-50, 453-4, 456.
85. **Ready, D., H. Lancaster, F. Qureshi, R. Bedi, P. Mullany, and M. Wilson.** 2004. Effect of amoxicillin use on oral microbiota in young children. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2883-7.
86. **Reddi, E., M. Ceccon, G. Valduga, G. Jori, J. C. Bommer, F. Elisei, L. Latterini, and U. Mazzucato.** 2002. Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins. *Photochem Photobiol* **75**:462-70.
87. **Renvert, S., J. Lessem, G. Dahlen, C. Lindahl, and M. Svensson.** 2006. Topical minocycline microspheres versus topical chlorhexidine gel as an adjunct to mechanical debridement of incipient peri-implant infections: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **33**:362-9.
88. **Renvert, S., J. Lessem, G. Dahlen, H. Renvert, and C. Lindahl.** 2008. Mechanical and repeated antimicrobial therapy using a local drug delivery system in the treatment of peri-implantitis: a randomized clinical trial. *J Periodontol* **79**:836-44.
89. **Renvert, S., J. Lessem, C. Lindahl, and M. Svensson.** 2004. Treatment of incipient peri-implant infections using topical minocycline microspheres versus topical chlorhexidine gel as an adjunct to mechanical debridement. *J Int Acad Periodontol* **6**:154-9.
90. **Renvert, S., C. Lindahl, A. M. Roos-Jansaker, and J. Lessem.** 2009. Short-term effects of an anti-inflammatory treatment on clinical parameters and serum levels of C-reactive protein and proinflammatory cytokines in subjects with periodontitis. *J Periodontol* **80**:892-900.
91. **Riep, B., P. Purucker, and J. P. Bernimoulin.** 1999. Repeated local metronidazole-therapy as adjunct to scaling and root planing in maintenance patients. *J Clin Periodontol* **26**:710-5.
92. **Roberts, M. C.** 1998. Antibiotic resistance in oral/respiratory bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* **9**:522-40.
93. **Scherrer, R., and P. Gerhardt.** 1971. Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *J Bacteriol* **107**:718-35.
94. **Selwitz, R. H., A. I. Ismail, and N. B. Pitts.** 2007. Dental caries. *Lancet* **369**:51-9.
95. **Sepetcioglu, F., and B. A. Ataman.** 1998. Long-term monitoring of microleakage of cavity varnish and adhesive resin with amalgam. *J Prosthet Dent* **79**:136-9.
96. **Serino, G., B. Rosling, P. Ramberg, M. K. Hellstrom, S. S. Socransky, and J. Lindhe.** 2001. The effect of systemic antibiotics in the treatment of patients with recurrent periodontitis. *J Clin Periodontol* **28**:411-8.
97. **Slots, J., and T. E. Rams.** 1990. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *J Clin Periodontol* **17**:479-93.
98. **Speer, B. S., N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers.** 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev* **5**:387-99.
99. **Sreenivasan, P., and A. Gaffar.** 2002. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol* **29**:965-74.
100. **Stein, O., and Y. Stein.** 1990. Recent developments in atherogenesis. *Arzneimittelforschung* **40**:348-50.
101. **Stiesch-Scholz, M., and M. Hannig.** 2000. In vitro study of enamel and dentin marginal integrity of composite and compomer restorations placed

- in primary teeth after diamond or Er:YAG laser cavity preparation. *J Adhes Dent* **2**:213-22.
102. **Suchett-Kaye, G., J. J. Morrier, and O. Barsotti.** 2001. Clinical usefulness of microbiological diagnostic tools in the management of periodontal disease. *Res Microbiol* **152**:631-9.
  103. **Szeimies, R. M., S. Karrer, S. Radakovic-Fijan, A. Tanew, P. G. Calzavara-Pinton, C. Zane, A. Sidoroff, M. Hempel, J. Ulrich, T. Proebstle, H. Meffert, M. Mulder, D. Salomon, H. C. Dittmar, J. W. Bauer, K. Kernland, and L. Braathen.** 2002. Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: A prospective, randomized study. *J Am Acad Dermatol* **47**:258-62.
  104. **Szeimies, R. M., C. A. Morton, A. Sidoroff, and L. R. Braathen.** 2005. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Acta Derm Venereol* **85**:483-90.
  105. **Tappeiner, H. v., and A. Jesionek.** 1903. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münch. Med. Wochenschau* **50**:2042-2044.
  106. **Thome, T., M. P. Mayer, S. Imazato, V. R. Geraldo-Martins, and M. M. Marques.** 2009. In vitro analysis of inhibitory effects of the antibacterial monomer MDPB-containing restorations on the progression of secondary root caries. *J Dent* **37**:705-11.
  107. **Tomas, I., L. Garcia-Caballero, M. Cousido, J. Limeres, M. Alvarez, and P. Diz.** 2009. Evaluation of chlorhexidine substantivity on salivary flora by epifluorescence microscopy. *Oral Dis.*
  108. **Vaara, M.** 1992. The outer membrane as the penetration barrier against mupirocin in gram-negative enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother* **29**:221-2.
  109. **Valduga, G., G. Bertoloni, E. Reddi, and G. Jori.** 1993. Effect of extracellularly generated singlet oxygen on gram-positive and gram-negative bacteria. *J Photochem Photobiol B* **21**:81-6.
  110. **Valduga, G., B. Breda, G. M. Giacometti, G. Jori, and E. Reddi.** 1999. Photosensitization of wild and mutant strains of *Escherichia coli* by meso-tetra (N-methyl-4-pyridyl)porphine. *Biochem Biophys Res Commun* **256**:84-8.
  111. **van Houte, J., J. Lopman, and R. Kent.** 1996. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. *J Dent Res* **75**:1008-14.
  112. **van Winkelhoff, A. J., et al. ().** 2005. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* **32(8)**:893-8.
  113. **Vanobbergen, J., L. De Visschere, M. Daems, A. Ceuppens, and J. Van Emelen.** Sociodemographic determinants for oral health risk profiles. *Int J Dent* **2010**:938936.
  114. **Villedieu, A., M. L. Diaz-Torres, N. Hunt, R. McNab, D. A. Spratt, M. Wilson, and P. Mullany.** 2003. Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:878-82.
  115. **Wainwright, M.** 1998. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* **42**:13-28.
  116. **Walker, C. B.** 1988. Microbiological effects of mouthrinses containing antimicrobials. *J Clin Periodontol* **15**:499-505.
  117. **Wilson, M.** 2001. Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog* **84**:235-54.

118. **Wilson, M.** 2004. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci* **3**:412-8.
119. **Wilson, M., and B. Henderson.** 1995. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *FEMS Microbiol Rev* **17**:365-79.
120. **Wolf, P.** 1999. Photodynamische Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* **22**:A-1493-A1498.

## 10. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
µs	Mikrosekunde
Abb.	Abbildung
<i>A. ac</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Aqua dest	Destilliertes Wasser
ATCC	
°C	Grad Celsius
CHX	Chlorhexidin
Da	Dalton
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultu- ren
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	
g	Gramm
Gram(+)	grampositiv
Gram(-)	gramnegativ
GTR	Gesteuerte Geweberegeneration
h	Stunde
J	Joule
KBE	Kolonie bildende Einheit
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
nm	Nanometer
nt	not tested
PBS	physiologischer Phosphatpuffer

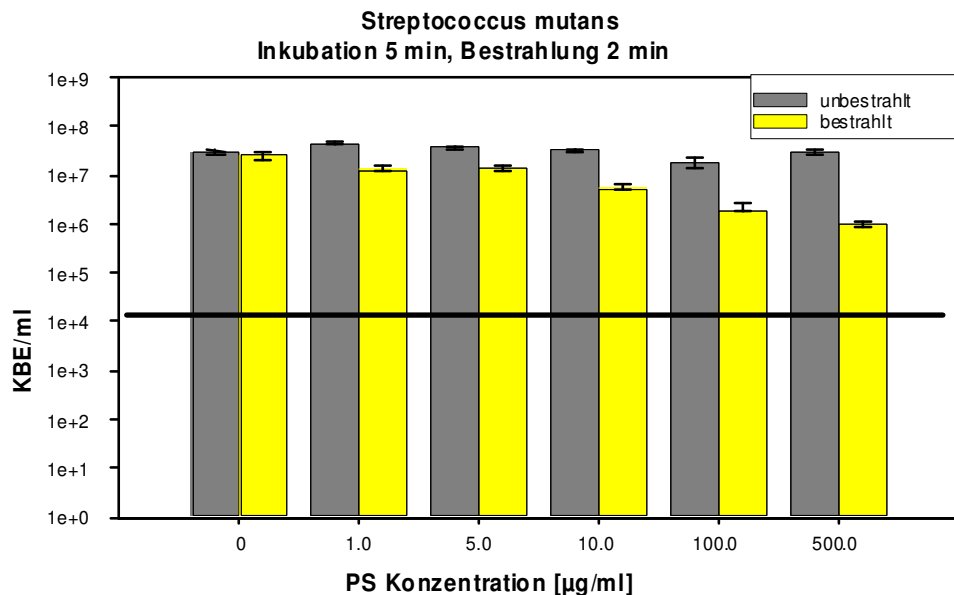


PDT	Photodynamische Therapie
PF	Photofrin
PIB	Photodynamische Inaktivierung von Bakterien
PS	Photosensibilisator
sek	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus aureus</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
TSBY	Trypticase-Soja-Hefeextrakt
Upm	Umdrehungen pro Minute

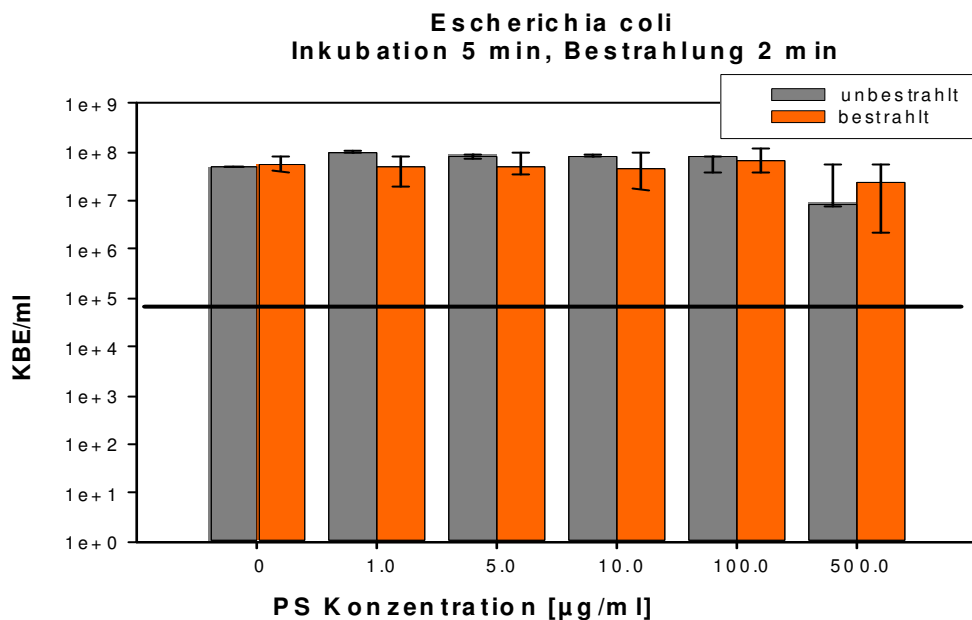
## 11. Abbildungen

**Abb. 8**

A)



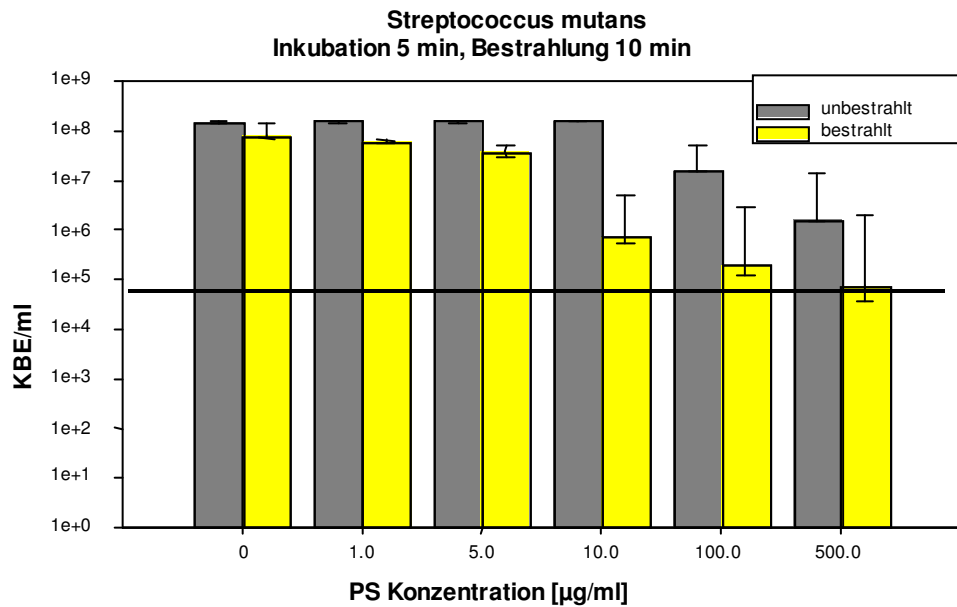
B)



**Abb. 8: Phototoxizität von Photosan<sup>®</sup> gegenüber *S. mutans* im Vergleich mit *E. coli***

Bakteriensuspensionen von *S. mutans* bzw. *E. coli* wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan<sup>®</sup> [µg/ml] für 5 min inkubiert und dann für 2 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 24 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Gelb (A) bzw. Orange (B): Photosan<sup>®</sup> mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan<sup>®</sup> in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

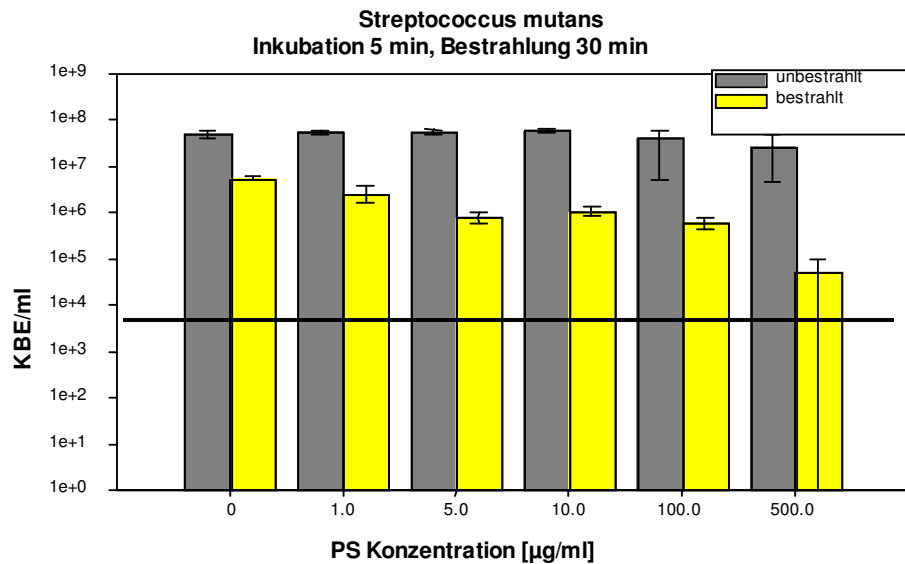
Abb. 9

**Abb. 9: Phototoxizität von Photosan® gegenüber *S. mutans***

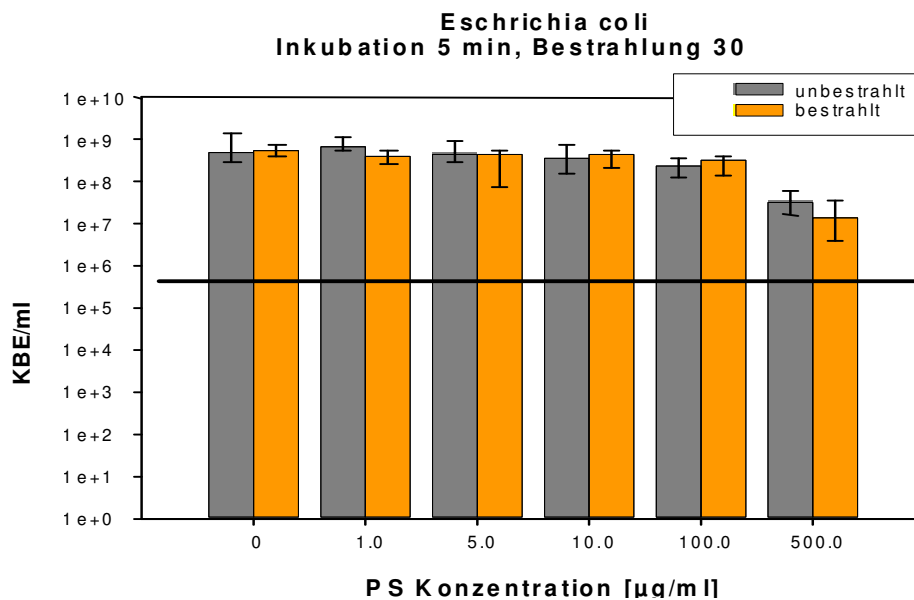
Eine Bakteriensuspension von *S. mutans* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan® [µg/ml] für 5 min inkubiert und dann für 10 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 24 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Gelb: Photosan® mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan® in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

Abb. 10

A)



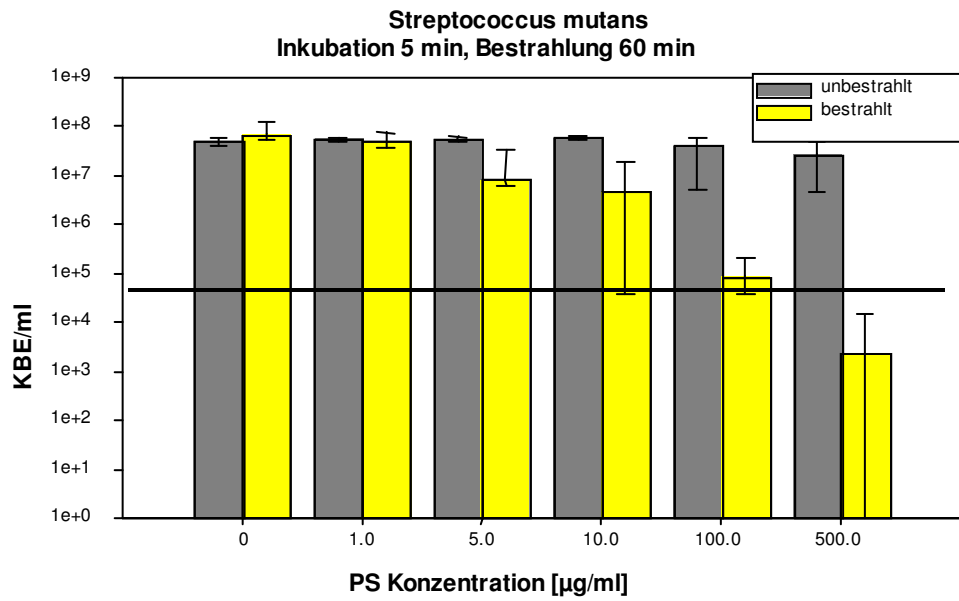
B)

Abb. 10: Phototoxizität von Photosan<sup>®</sup> gegenüber *S. mutans* im Vergleich mit *E. coli*

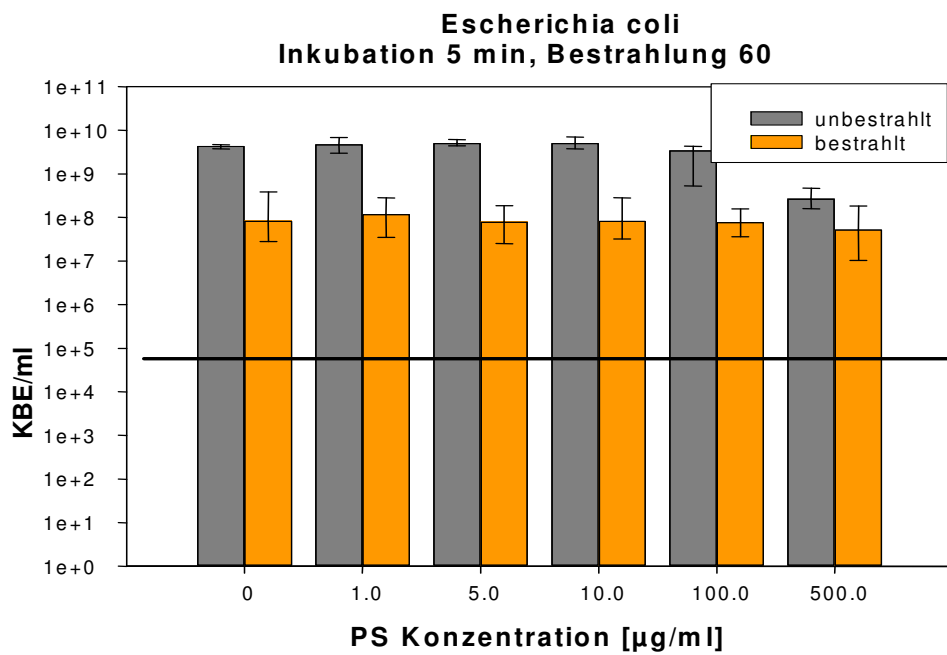
Bakteriensuspensionen von *S. mutans* bzw. *E. coli* wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan<sup>®</sup> [ $\mu\text{g/ml}$ ] für 5 min inkubiert und dann für 30 min bestrahlt ( $40 \text{ mW/cm}^2$ ). Nach 48 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Gelb (A) bzw. Orange (B): Photosan<sup>®</sup> mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan<sup>®</sup> in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3  $\log_{10}$ -Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

Abb. 11

A)



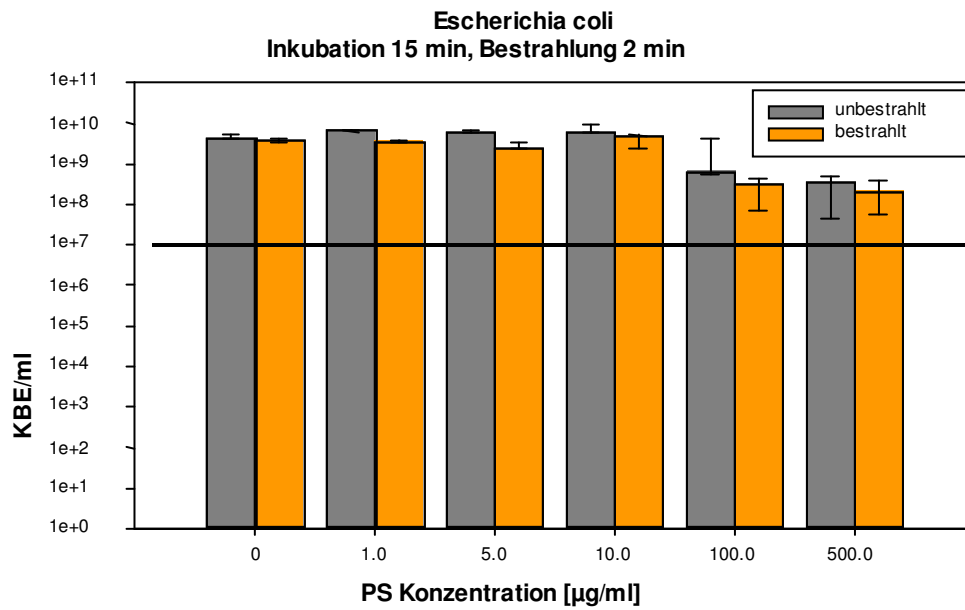
B)



**Abb. 11: Phototoxizität von Photosan<sup>®</sup> gegenüber *S. mutans* im Vergleich mit *E. coli***

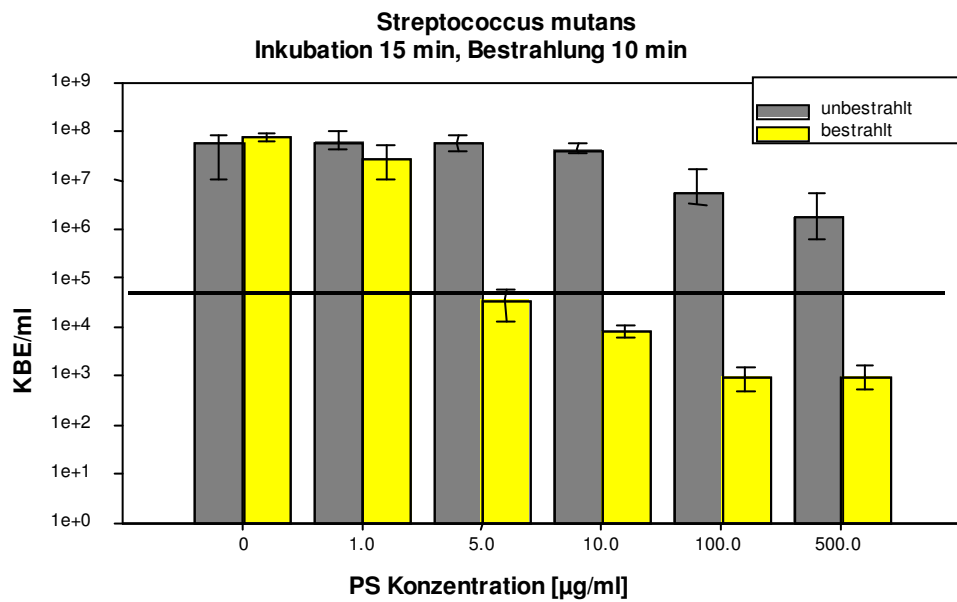
Bakteriensuspensionen von *S. mutans* bzw. *E. coli* wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan<sup>®</sup> [ $\mu\text{g/ml}$ ] für 5 min inkubiert und dann für 60 min bestrahlt ( $40 \text{ mW/cm}^2$ ). Nach 48 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Gelb (A) bzw. Orange (B): Photosan<sup>®</sup> mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan<sup>®</sup> in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3  $\log_{10}$ -Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

Abb.12

**Abb. 12: Phototoxizität von Photosan<sup>®</sup> gegenüber *E. coli***

Eine Bakteriensuspension von *E. coli* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan<sup>®</sup> [µg/ml] für 15 min inkubiert und dann für 2 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 24 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Orange: Photosan<sup>®</sup> mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan<sup>®</sup> in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

Abb. 13

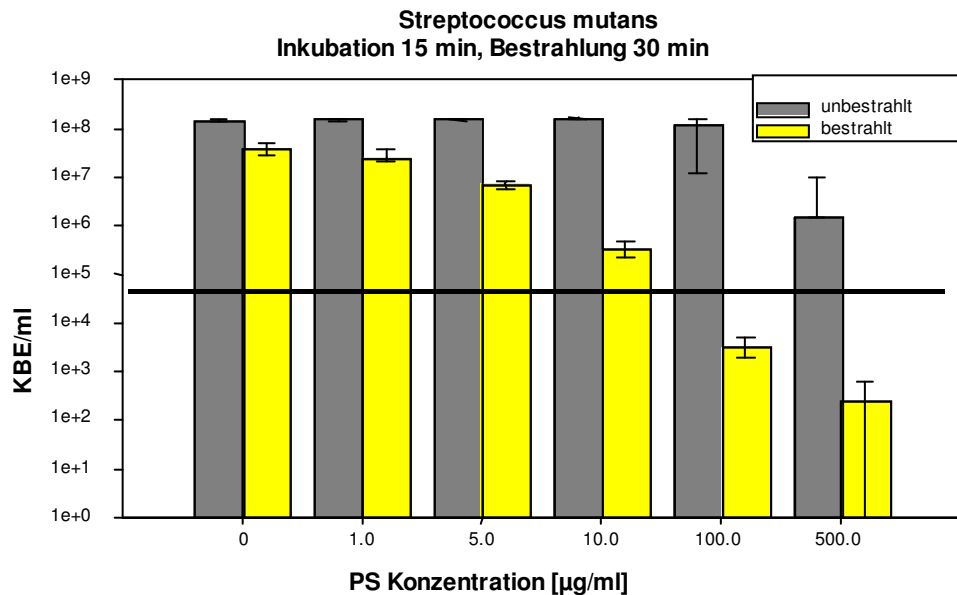
Abb. 13: Phototoxizität von Photosan® gegenüber *S. mutans*

Eine Bakteriensuspension von *S. mutans* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan® [µg/ml] für 15 min inkubiert und dann für 10 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 24 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Gelb: Photosan® mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan® in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

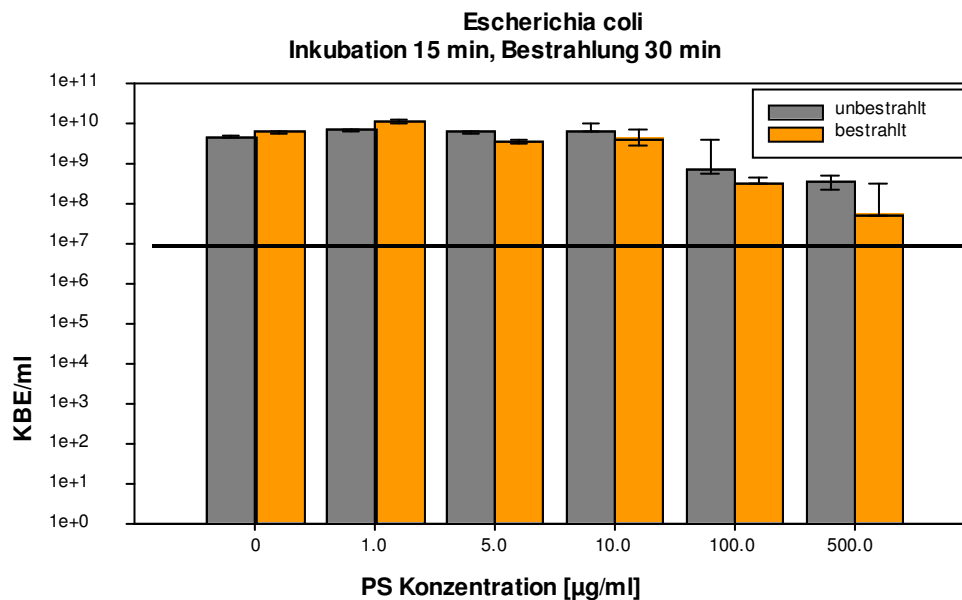


Abb. 14

A)

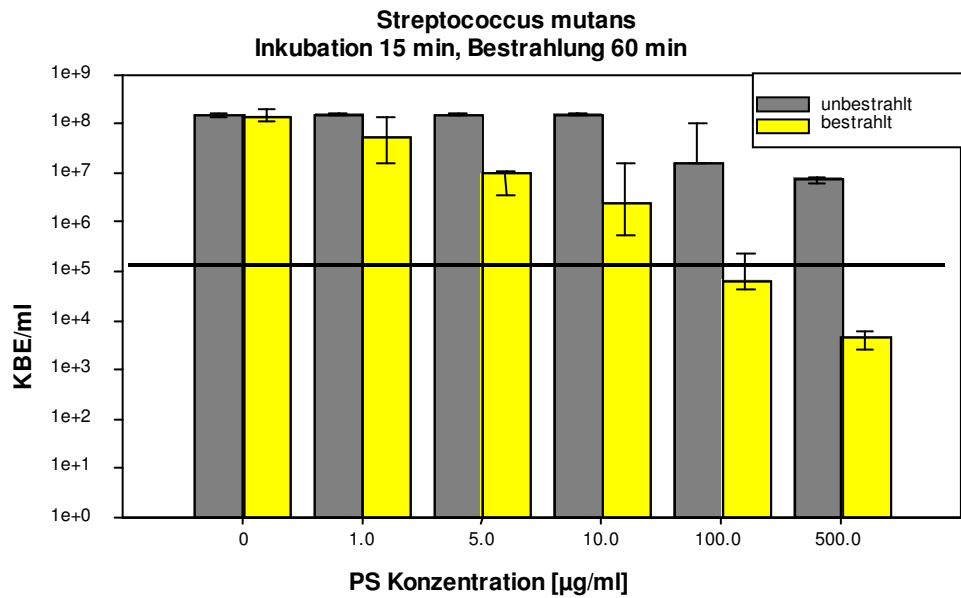


B)

Abb. 14: Phototoxizität von Photosan<sup>®</sup> gegenüber *S. mutans* im Vergleich mit *E. coli*

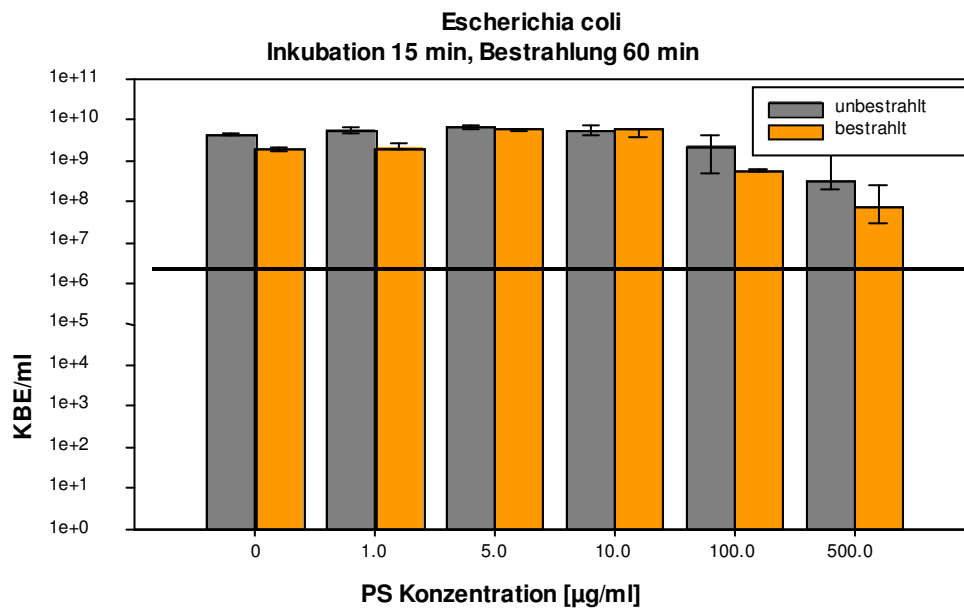
Bakteriensuspensionen von *S. mutans* bzw. *E. coli* wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan<sup>®</sup> [µg/ml] für 15 min inkubiert und dann für 30 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 24 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Gelb (A) bzw. Orange (B): Photosan<sup>®</sup> mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan<sup>®</sup> in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

Abb. 15

Abb. 15: Phototoxizität von Photosan<sup>®</sup> gegenüber *S. mutans*

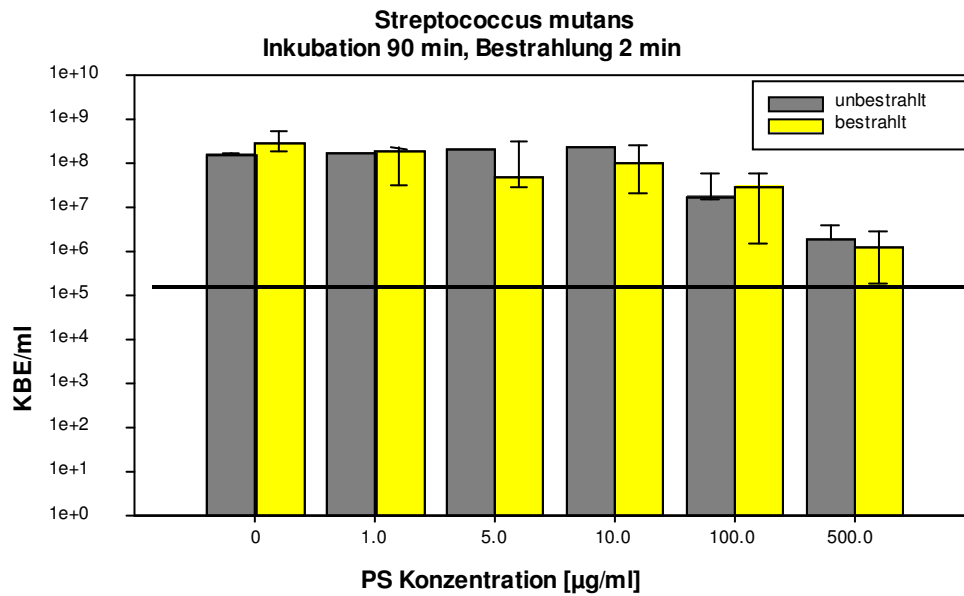
Eine Bakteriensuspension von *S. mutans* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan<sup>®</sup> [µg/ml] für 15 min inkubiert und dann für 60 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 24 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Gelb: Photosan<sup>®</sup> mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan<sup>®</sup> in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

Abb. 16

**Abb. 16: Phototoxizität von Photosan® gegenüber *E. coli***

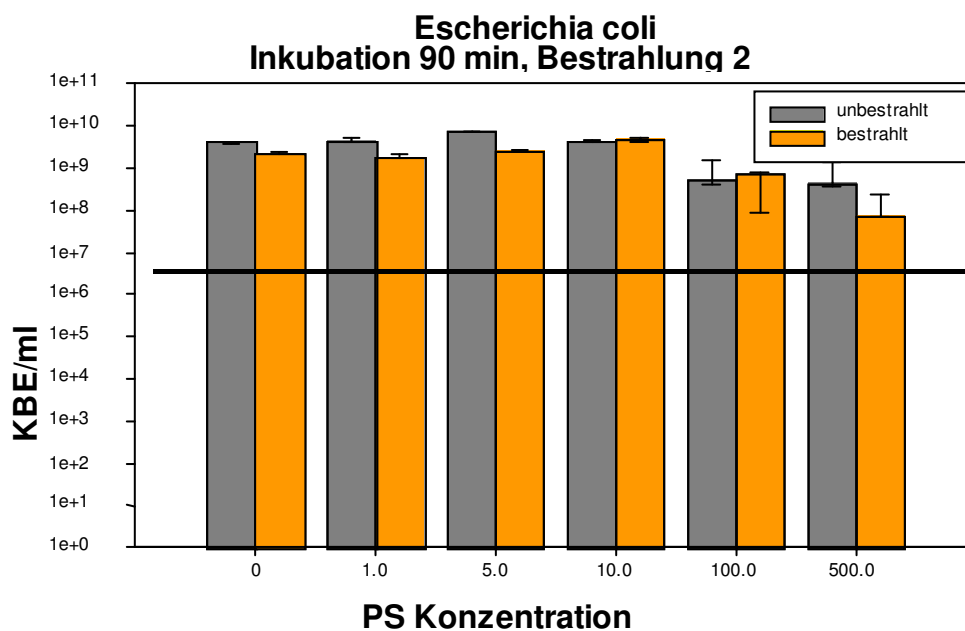
Eine Bakteriensuspension von *E. coli* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan® [µg/ml] für 15 min inkubiert und dann für 60 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 24 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Orange: Photosan® mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan® in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

Abb. 17

Abb. 17: Phototoxizität von Photosan® gegenüber *S. mutans*

Eine Bakteriensuspension von *S. mutans* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan® [µg/ml] für 90 min inkubiert und dann für 2 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 48 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Gelb: Photosan® mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan® in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

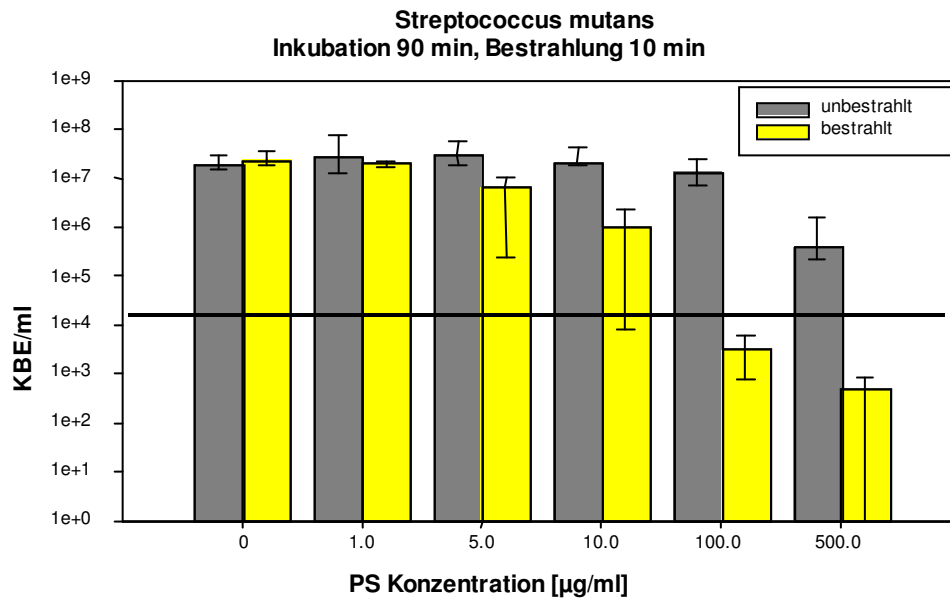
Abb. 18



**Abb. 18: Phototoxizität von Photosan<sup>®</sup> gegenüber *E. coli***

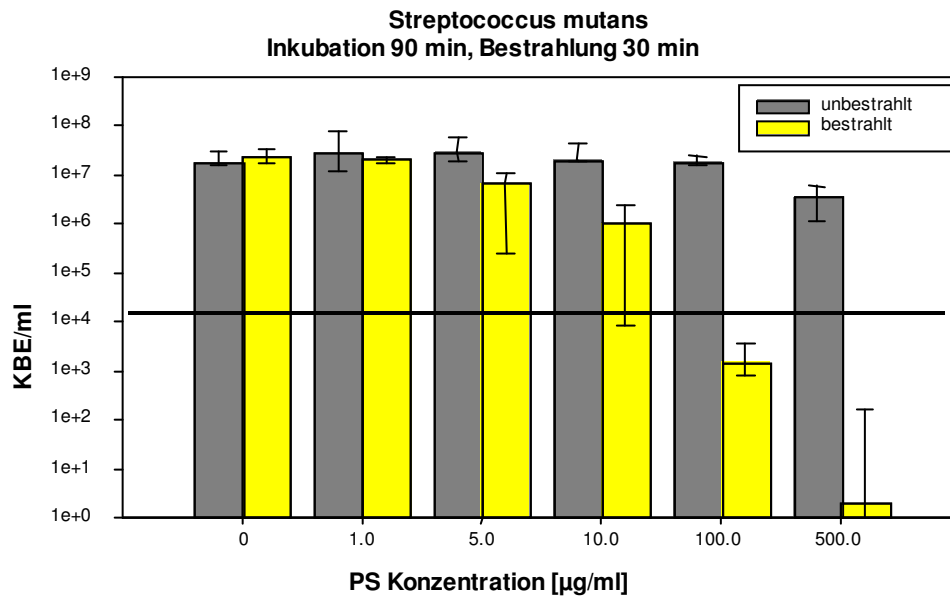
Eine Bakteriensuspension von *E. coli* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan<sup>®</sup> [µg/ml] für 90 min inkubiert und dann für 2 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 24 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Orange: Photosan<sup>®</sup> mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan<sup>®</sup> in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

Abb. 19

Abb. 19: Phototoxizität von Photosan® gegenüber *S. mutans*

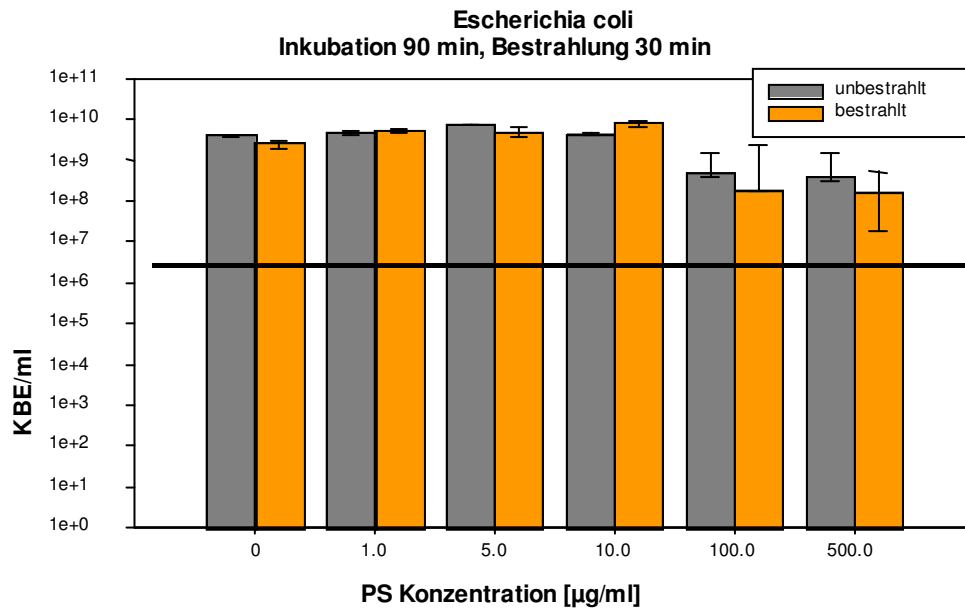
Eine Bakteriensuspension von *S. mutans* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan® [µg/ml] für 90 min inkubiert und dann für 10 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 24 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Gelb: Photosan® mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan® in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

Abb. 20

Abb. 20: Phototoxizität von Photosan® gegenüber *S. mutans*

Eine Bakteriensuspension von *S. mutans* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan® [µg/ml] für 90 min inkubiert und dann für 30 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 24 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Gelb: Photosan® mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan® in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

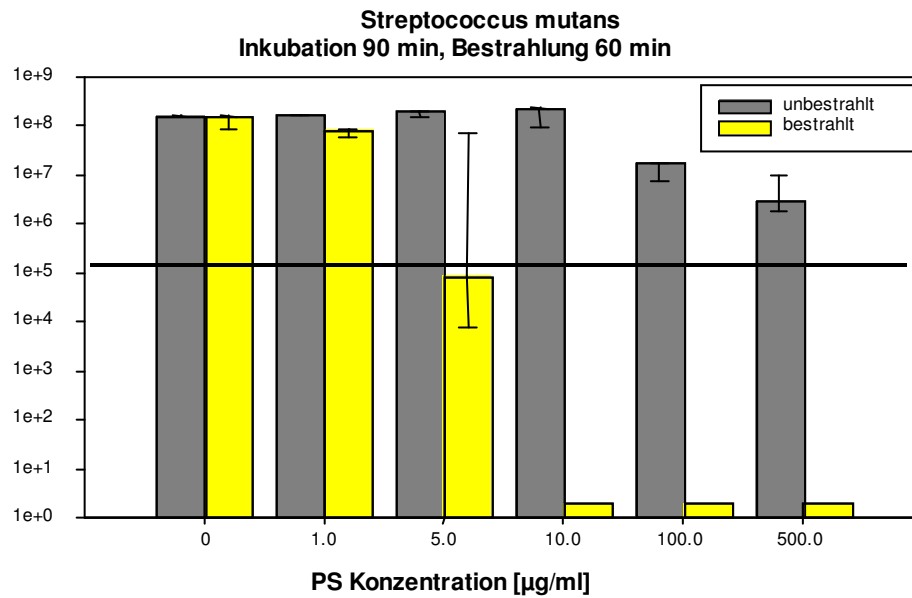
Abb. 21

**Abb. 21: Phototoxizität von Photosan® gegenüber *E. coli***

Eine Bakteriensuspension von *E. coli* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan® [µg/ml] für 90 min inkubiert und dann für 30 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 24 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Orange: Photosan® mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan® in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

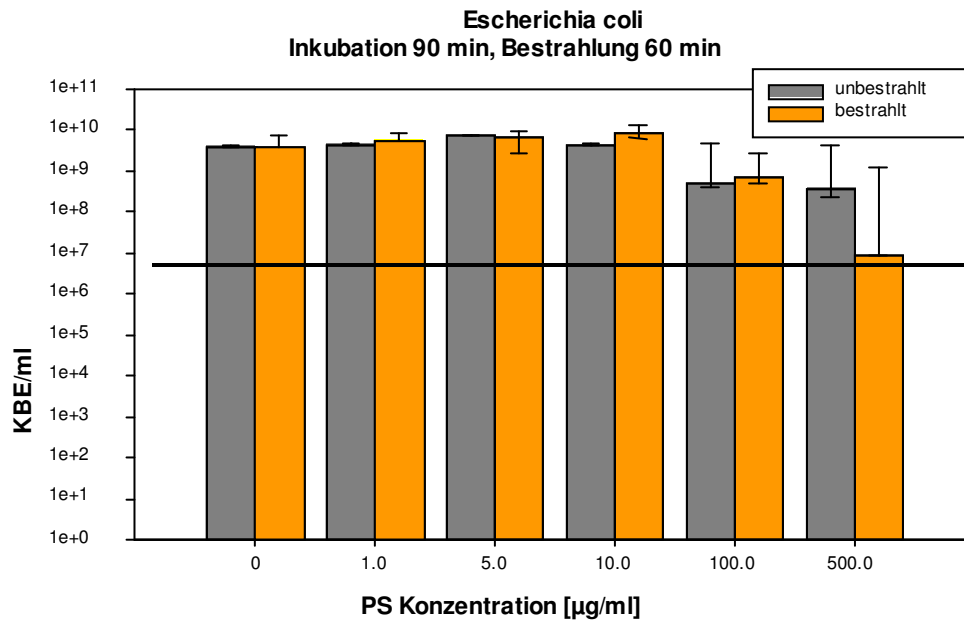


Abb. 22

**Abb. 22: Phototoxizität von Photosan® gegenüber *S. mutans***

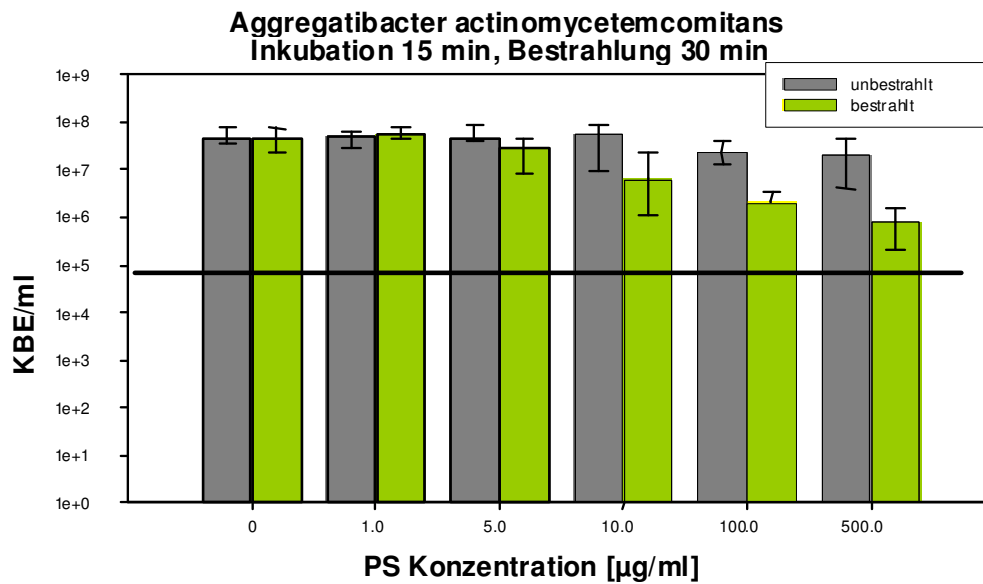
Eine Bakteriensuspension von *S. mutans* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan® [µg/ml] für 90 min inkubiert und dann für 60 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 24 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Gelb: Photosan® mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan® in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

Abb. 23

**Abb. 23: Phototoxizität von Photosan<sup>®</sup> gegenüber *E. coli***

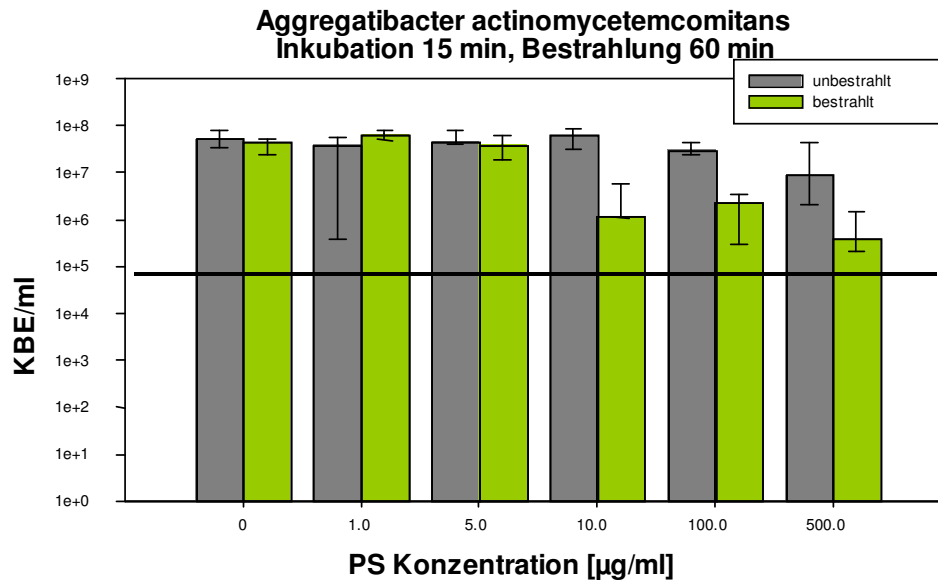
Eine Bakteriensuspension von *E. coli* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan<sup>®</sup> [µg/ml] für 90 min inkubiert und dann für 60 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 24 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Orange: Photosan<sup>®</sup> mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan<sup>®</sup> in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

Abb. 24

**Abb. 24: Phototoxizität von Photosan® gegenüber *A. ac***

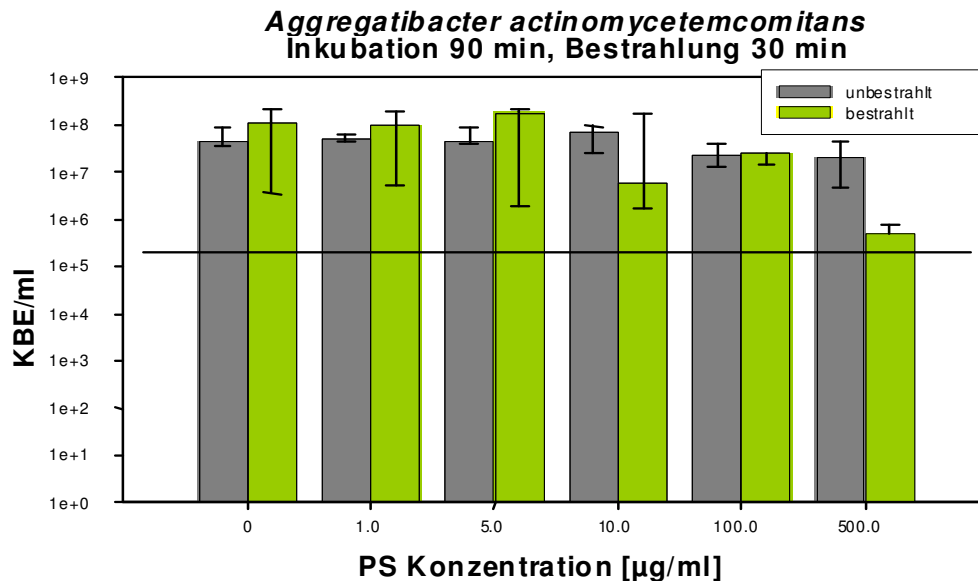
Eine Bakteriensuspension von *A. ac* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan® [µg/ml] für 15 min inkubiert und dann für 30 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 48 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Grün: Photosan® mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan® in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

Abb. 25

Abb. 25: Phototoxizität von Photosan® gegenüber *A. ac*

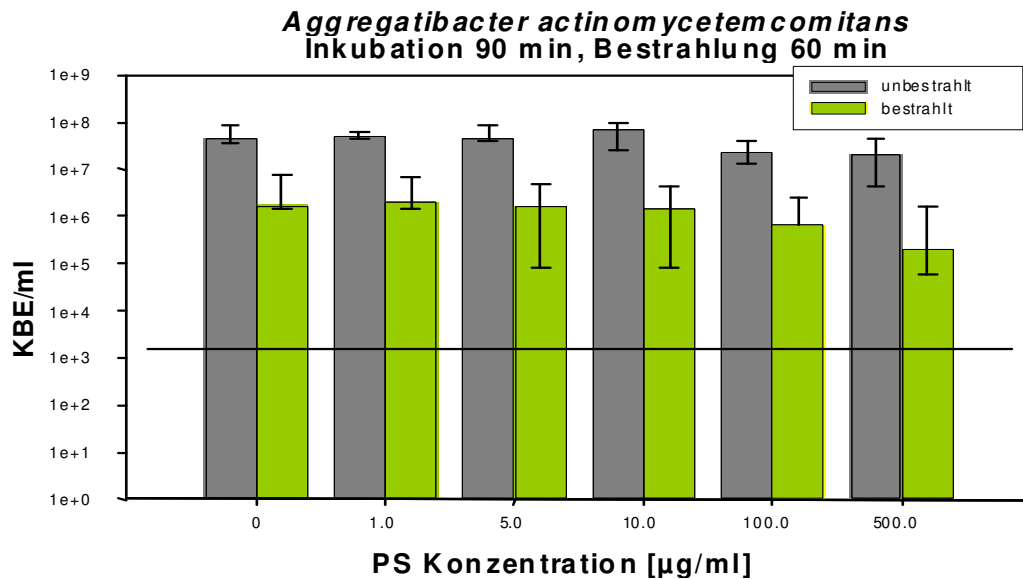
Eine Bakteriensuspension von *A. ac* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan® [µg/ml] für 15 min inkubiert und dann für 60 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 48 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Grün: Photosan® mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan® in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

Abb. 26

Abb. 26: Phototoxizität von Photosan® gegenüber *A. ac*

Eine Bakteriensuspension von *A. ac* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan® [µg/ml] für 90 min inkubiert und dann für 30 min bestrahlt (40 mW/cm<sup>2</sup>). Nach 48 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Grün: Photosan® mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan® in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3 log<sub>10</sub>-Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

Abb. 27

Abb. 27: Phototoxizität von Photosan<sup>®</sup> gegenüber *A. ac*

Eine Bakteriensuspension von *A. ac* wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan<sup>®</sup> [ $\mu\text{g/ml}$ ] für 90 min inkubiert und dann für 60 min bestrahlt ( $40 \text{ mW/cm}^2$ ). Nach 48 h erfolgte die Auszählung der KBE/ml. Grün: Photosan<sup>®</sup> mit anschließender Bestrahlung; Grau: Photosan<sup>®</sup> in der Dunkelkontrolle. Die schwarze horizontale Linie kennzeichnet eine Abnahme um 3  $\log_{10}$ -Stufen, was einer Reduktion der Zellvitalität von 99,9% entspricht.

## 12. Lebenslauf

1979	02.01. geboren in Neukirchen b. Hl. Blut
1985	Einschulung Grund- und Hauptschule Lam
1991	Übertritt an die staatliche Realschule in Kötzing
1995	Übertritt an das Goethe-Gymnasium in Regensburg
1999	Abitur am Goethe-Gymnasium in Regensburg
August 1999	Antritt zum Zivildienst im Bürgerheim Kumpfmühl
September 2000	Berufsfachschule für Musik Sulzbach-Rosenberg
2001	Immatrikulation an der Uni Regensburg (Zahnmedizin)
2002	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
2003	Zahnärztliche Vorprüfung
2006	Staatsexamen
2006	Vorbereitungsassistent in Gemeinschaftspraxis Dr. Friedrich Korden, Hilke Diestl und Caroline Zoder, Hamburg
2007	Vorbereitungsassistent in Praxis Dr. Frauke Reichert, Reinbek bei Hamburg
2008	Niedergelassen als Zahnarzt in Gemeinschaftspraxis Dr. Frauke Reichert-Mohnen und Hans-Jürgen Nerl, Reinbek bei Hamburg
2009	Angestellt in Praxis Dr. Müller-Böhm, München

### **13. Danksagung**

Bei Herrn Prof. Dr. Schmalz bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Durchführung dieser Promotionsarbeit in der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie.

Bei Herrn Dr. Hiller bedanke ich mich für die äußerst hilfsbereite Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und der Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Landthaler danke ich herzlich für die Bereitstellung des Laborplatzes und der technischen Ausrüstung, die ich zur Durchführung des praktischen Teils der Arbeit nutzen durfte.

Im Besonderen gilt mein Dank Privatdozent Dr. Tim Maisch, der mich durch sein unermüdliches Engagement und uneingeschränkte Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit begleitet hat. Die gemeinsam verbrachte Zeit innerhalb und außerhalb des Labors wird mir stets in bester Erinnerung bleiben.

Meinen Eltern danke ich von Herzen, dass sie mich während meiner Ausbildung moralisch und tatkräftig unterstützt haben und mir dieses Studium ermöglichten.